

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 01/14560 A1**

(51) 国際特許分類: C12N 15/29, C07K 14/415,  
C12N 5/10, A01H 5/00, C12P 21/02

Shigeru) [JP/JP]; 〒444-0874 愛知県岡崎市竜美南  
2-4-1-3-21 Aichi (JP). 田中幸子 (TANAKA, Sachiko)  
[JP/JP]; 〒444-0802 愛知県岡崎市美合町五本松61番  
地 Aichi (JP). 稲垣善茂 (INAGAKI, Yoshishige) [JP/JP];  
〒444-0851 愛知県岡崎市久後崎町宮下2 城南ハイ  
ツ105 Aichi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05722

(22) 国際出願日: 2000年8月24日 (24.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒  
105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37  
森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国(国内): AU, CA, JP, NZ, US.

(30) 優先権データ:  
特願平11/236800 1999年8月24日 (24.08.1999) JP

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): サント  
リー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-  
8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka  
(JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 飯田 滋 (IIDA,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイドブック」を参照。

(54) Title: GENES ENCODING PROTEINS REGULATING pH OF VACUOLES

(54) 発明の名称: 液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子

(57) Abstract: Genes encoding proteins having an activity of regulating the pH of vacuoles, for example, a gene originating in morning glory and encoding a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2. When inserted into a plant and expressed therein, such a gene can control the flower color via the regulation of the vacuolar pH.

(57) 要約:

液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、例  
えばアサガオに由来し、配列番号: 2に示すようなアミノ酸配列を  
有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子を植物に  
挿入して発現せしめることにより、液胞のpHの調節を介して花の色  
を制御することができる。

WO 01/14560 A1



## 明 細 書

## 液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子

## 発明の技術分野

本発明は液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子およびその利用方法に関するものである。

## 背景技術

花き産業においては、顯花植物の新規なあるいは多様性に富んだ新品種の開発が重要であり、なかでも、花の色は花きの最も重要な形質のひとつである。交配による従来の育種により、さまざまな色の品種が育種されてきたが、単一の植物種がすべての色の品種を有することはまれであり、さまざまな色の品種開発が望まれている。

花の色の主な成分は、アントシアニンと総称されるフラボノイドの一群の化合物である。植物には多様なアントシアニンが存在することは知られており、それらの多くの構造が既に決定されている。アントシアニンの色は、一部は、その構造に依存している。アントシアニンの生合成に関わる酵素や遺伝子に関しても研究が進んでおり、分子生物学的手法と植物への遺伝子導入により、アントシアニンの構造を変換し、花の色を変えた例もある (Plant Cell, 7 (1995) Holton and Cornish, p. 1071 , Plant Cell Physiol. 39 (1998)

Tanaka et al, p1119.)。また、アントシアニンの色は、水溶液のpHにも依存し、同じアントシアニンでも水溶液のpHが中性から弱いアルカリ性で青く見える (現代化学、(1998年5月) 本田と斎藤、p. 25)。

アントシアニンは細胞の液胞に存在するため、液胞のpHが花の色

に大きな影響を与えることも知られている (Plant Cell, 7 (1995) Holton and Cornish , Trends Plant Sci. 3 (1998) Mol et al. p212 )。たとえば、アサガオ (*Ipomea tricolor*) においては、赤紫色のつぼみが開花したときに青くなるのは、花弁上皮細胞の液胞のpHが6.6 から7.7 に上昇するためであることが知られている (Nature, 373 (1995), Yoshida et al. p291)。

植物細胞の液胞はおもに液胞プロトン輸送ATPaseと液胞プロトン輸送ピロフォスファターゼによって制御されているとされる (The Plant Vacuole, (1997) Leigh et al. Academic Press) が、これらのプロトンポンプが花の色にどのように関わっているかは明確ではない。また、ナトリウムイオン-プロトンアンチポーター (以下、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターと記載) が植物の液胞に存在すること、また、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターは、液胞の外と中のプロトン濃度勾配に依存してナトリウムイオンを液胞内に輸送し、その際プロトンが液胞外に輸送され、プロトン濃度勾配が減少することが知られていた。

さらに、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターは、分子量約17万の蛋白質であることが示唆されていた。しかしながら、液胞のpHの制御には多くの未知の要因があり、どのようにして液胞、特に花弁液胞のpHが制御されているのかは、不明確である (以上The Plant Vacuole, (1997) Leigh et al. Academic Press)。また、植物液胞のpHを人為的に上昇させ、産業上有用な形質が得られたこともなく、花の色との関連も不明である。

また、分子量約7万の $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子がアラビドプシスからクローニングされ、この遺伝子を導入した酵母は耐塩性を獲得したことは知られているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) Gaxiola et al. p1480 ~1485)、このアンチポーター

が植物細胞の液胞のpHを制御しているかどうか、あるいは花の色に関わっているかどうかは知られていない。

一方、ペチュニアには花弁の液胞のpH制御に関わっている遺伝子座が7種あることがわかっており、これらのうちの一つがホモの劣性になることにより花弁の液胞のpHが上昇するとされている (Plant J. 13 (1998) van Houwelingen et al. P39, Trends Plant Sci. 3 (1998) Mol et al. p212)。そのうちの一つPh6はすでにクローン化されていて、転写調節因子の一種であることがわかったが (Plant Cell 5 (1993) Chuck et al. p371)、実際にどのような生化学的な機構で液胞のpHを制御しているかは不明である。

また、アサガオ (*Ipomea nil*)においては、変異体の解析から花と葉の色や形に関わる遺伝子座がいくつかあり、これらのうち 19 が易変異性であることが知られている (植物細胞工学シリーズ 5 (1996) p132, 飯田ら 秀潤社, Annal. New York Acad. Sci., (1999) Iida et al. p870)。これらの内で、青色ではなく紫色の花を咲かせるようになった劣性の変異により規定される 1 遺伝子座を Purple 遺伝子座と呼び (T. Hagiwara (1931) The genetics of flower colours in Phrabitis nil. J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo 51, 241-262. ; Y. Imai (1931) Analysis of flower colour in Pharbitis nil. J. Genet., 24: 203-224.)、紫の花弁に青いセクターを生じる花を咲かせる易変異変異のアリールは、purple-mutable (pr-m) と名付けられた (J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo, 12 (1934) Imai, p479)。なお、Purple 遺伝子座に由来する遺伝子を Purple 遺伝子と記す。

この青い部分は劣性の purple からの体細胞復帰突然変異により生じたと考えられ、さらに生殖細胞復帰突然変異体も分離できる。これら復帰突然変異体の復帰突然変異により生じたアリールをここで

はPurple-revertant(Pr-r)と名付ける。このような古典遺伝学的解析は、このPurple遺伝子に関しては行われていたが、このPurple遺伝子の実体や花弁液胞のpHの調節との関連等は全く不明であった。

液胞のpHを改変できれば、たとえば液胞のpHを上昇させることにより、花の色を青くすることができるであろうと考えられる。青い色のない植物種の代表例として、バラ、キク、カーネーション、ガーベラなどがあり、これらはきわめて重要な切り花である。液胞pHの改変の重要性は認識されてきたが、今までに花弁の液胞のpHを制御する蛋白質の実態は不明であり、これをコードする遺伝子の単離が望まれていた。

## 発明の開示

本発明は、植物細胞の液胞のpHを制御する蛋白質の遺伝子、好ましくは液胞でプロトンを輸送する蛋白質の遺伝子、より好ましくは $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーター遺伝子を提供しようとするものである。本発明の遺伝子を植物に導入し、発現させることで、花色を調節し、好ましくは青色化することが可能である。

従って、本発明は、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子は、好ましくは $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターをコードする遺伝子であり、例えば、配列番号：2記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子、あるいは配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／または他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して20%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；あるいは配列番号：2

記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸の一部または全部に対して、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である。

本発明はまた、前記の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はまた、前記のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

本発明はまた、前記の遺伝子によってコードされる蛋白質を提供する。

本発明はさらに、前記の宿主細胞を培養し、又は生育させ、そして該宿主細胞から液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法を提供する。

本発明はまた、前記の遺伝子、または前記のベクターが導入された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織を提供する。

本発明はまた、前記の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花を提供する。

本発明はさらに、前記の遺伝子、または前記のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、液胞の pH を制御する方法を提供する。

本発明はさらに、前記の遺伝子、または前記のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、植物体の花の色を調節する方法を提供する。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、プラスミド p SPB 607 の構造を示す図である。

図 2 は、プラスミド p SPB 608 の構造を示す図である。

図3は、プラスミドpINA 145の構造を示す図である。

図4は、プラスミドpINA 147の構造を示す図である。

### 発明の実施の形態

アサガオの遺伝子座Purpleは優性であると花弁の色は青で、ホモの劣性となると青い花弁が紫となる。この遺伝子座が花の色に関わっていることは明らかではあるが、その機構については不明である。

まず、pr-m変異体とその復帰突然変異体の花弁色素を化学分析したところ、両者の色素組成に差違は認められなかった。青色花アサガオの蕾は赤紫色で開花に伴って青色に変化するのは、前述のように、花弁細胞液胞のpH変化によると考えられる。

pr-m変異体では、開花に伴って青色に変化せず、さらに開花した花弁細胞の液胞のpHは、pr-m変異体のほうがPr-rに比べて低かった。それゆえ、Purple遺伝子は開花時の花弁細胞液胞内のpHを制御し、花色を調節する遺伝子と考えられる。そこで、pr-m変異体とその復帰突然変異体を用いて、トランスポゾン・ディスプレー法により、まずpr-mに特異的に存在するPurple遺伝子配列を含むゲノムDNAの断片を同定し、ついでPurple遺伝子を同定した。今回得られたPurple遺伝子は驚くべきことにアラビドプシスなどの $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターと相同性を持ち、pr-m変異はPurple遺伝子の5'非翻訳領域中にトランスポゾンが挿入されていた。

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号：2に記載するアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質も、との蛋白質と同様の活性を維持することが知られている。従って本発明は、液胞のpH

を制御する活性を有している蛋白質である限り、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質および当該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に属する。

本発明はまた、配列番号：1に記載の塩基配列または配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはそれらの塩基配列の一部分をコードする塩基配列に対して、ストリングエントな条件下、例えば5xSSC、50°Cの条件下でハイブリダイズし、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。なお、適切なハイブリダイゼーション温度は塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えばアミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとした場合には50°C以下の温度が好ましい。

このようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、例えば、ペチュニアやトレニア由来の遺伝子が挙げられるが、植物以外の由来であってもよい。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

また、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーター遺伝子はスーパーファミリーを形成しており (FEBS Lett. 424(1998) Debrov et al., p1)、アミノ酸配列で20%以上の相同性を有する (J. Biol. Chem. 272(1997) Orlowski et al., p22373)。

そこで本発明はさらに配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して約20%以上、好ましくは50%以上、例えば60%または70%以上、の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。

生来の塩基配列を有する遺伝子は実施例に具体的に示すように、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAは生来の塩基配列を有するDNAを基礎として、常用の部位特定変異誘発やPCR法を用いて合成することができる。例えば修飾を導入したいDNA断片を生来のcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望の修飾を導入したDNA断片を得る。その後、この変異を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA断片を合成し、連結すればよい。

本発明はアサガオ由来の液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子のみに限定されるものではなく、起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、液胞においてプロトンを汲み出すトポロジーを持っていればよい。

また、得られた遺伝子を大腸菌または酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、活性を測定することにより、得られた遺伝子が液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードすることを確認することができる。さらに、当該遺伝子を発現させることにより、遺伝子産物である液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質を得ることができる。あるいはまた、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対する抗体を用いても、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質を

得ることができ、抗体を用いて他の生物の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をクローニングすることもできる。

従って本発明はまた、前述の遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) 、バシルス (*Bacillus*) 属微生物、例えばバシルス・スブシリス (*Bacillus subtilis*) など常用の宿主を用いることができる。真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母または糸状菌が使用できる。

酵母としては例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 、ペニシリウム (*Penicillium*) 属微生物が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーターおよびターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えば trc プロモーター、tac プロモーター、lac プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PH05 プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては

例えばアミラーゼプロモーター、*trpC*プロモーター等が使用される。

また動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常用に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も常法に従って行うことができる。

前記の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養、栽培または飼育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とするタンパク質を回収、精製することができる。

さらに本発明は、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、具体的には、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子を導入することにより、色合いが調節された植物もしくはその子孫又はこれらの組織に関するものであり、その形態は切り花であってもよい。本発明で得た液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を用いると、液胞においてプロトンの細胞質への汲み出しとナトリウムイオンの汲み入れを行うことができ、液胞内に蓄積しているアントシアニンを青くでき、結果として花の色を青くすることができる。

また、本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、液胞のpHを下げることも可能である。現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法やコサブレッション法によって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。

形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション

、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カラシコエ、ユリ、ペラルゴニアム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、ダイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

## 実施例

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

### 実施例 1. 生殖細胞復帰突然変異体の取得

生殖細胞復帰突然変異体の取得に関しては、すでに報告がある（植物細胞工学シリーズ 5 (1996) p132, 飯田ら 秀潤社、Annal. New York Acad. Sci., (1999) Iida et al. p870、Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p 375、Theor. Appl. Genet. 92 (1996) Inagaki et al. p499）。

遺伝子型 ( $Pr-r/pr-m$ ) を有するアサガオ (Iida et al. p870、Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p 375、Theor. Appl. Genet. 92 (1996) Inagaki et al. p499) を自家受粉し、後代の種子を蒔き、それら自殖後代の花を観察して、復帰突然変異により青花を咲かせる個体を選抜し、さらにこの生殖細胞復帰突然変異体の自殖後代で、紫花を咲かせる分離体が得られるか否かでホモかヘテロかを検証し、遺伝子型 ( $Pr-r/ Pr-r$ ) および ( $pr-m/pr-m$ ) を有するものを選択した。

### 実施例 2. 復帰変異体花弁のアントシアニン

アサガオに含まれるアントシアニンはおもにヘブンリブルーアン

トシアニンであり、その他にいくつかのアントシアニンが含まれる (Phytochemistry 31 (1992) Lu et al. P659)。実施例1で得られたPr-r/ Pr-r株とpr-m/pr-m 株の開いた花弁を同様に解析したところ、両者に含まれるアントシアニンはほぼ同一であった。

セロハンテープを表側の花弁に貼り、剥がすことにより一層の上皮細胞だけを回収し、ここから細胞液をメスなどで搔き取り遠心して搾汁を得た。搾汁をホリバB212pH メーター（株式会社堀場製作所）にてpHを測定した。Pr-r/ Pr-r株の花弁上皮細胞のpHは約7.1であったのに対し、pr-m/pr-m 株の花弁上皮細胞のpHは約6.5 であった。この結果は、purpleの変異による花色の変化は、アントシアニンの構造によるものではなく液胞のpHの変化によるものであることを示す。

### 実施例3. pr-m に特異的に存在するゲノム断片の単離

遺伝子の単離にはトランスポゾンディスプレー法（たとえばPlant J. 13 (1998) Frey et al. p 717, Plant J. 13 (1998) Van den Broeck et al. p121）あるいは類似の方法（植物細胞工学シリーズ7 (1997)、土生ら、p144, 秀潤社）を用い、pr-m/pr-m 株とPr-w/pr-m 株には存在し、Pr-r/ Pr-r株と野性株には存在しないDNA のバンドを探した。アサガオにおいてはTpnl関連のトランスポゾンが主に易変異性に関与していると考えられるので、ここでもTpnl関連のトランスポゾンに着目した。

具体的には、pr-m/pr-m 株から染色体DNA を抽出し、125ng を20 μl 中でMseIで消化した。消化したDNA に80 pmole のMseIアダプター (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' (配列番号：3) と 5'-TACTCAGGACTCA T-3' (配列番号：4) をアニールしたもの) を25μl 中で20°Cで2 時間付加した。75°Cで10分間保持した後、-20 °Cで保管した。これを10倍希釈した後、2 μl を鋳型とし、これを4.8 pmole のTIR プ

ライマー (5' -TGTGCATTTTCTTGTAGTG-3' (配列番号 : 5) 、トランスポゾン TpnI の末端逆位繰り返し配列を含む) と 4.8 pmole の MseI プライマー (5' -GATGAGTCCTGAGTAA-3' ) (配列番号 : 6) を用いて 20 μl 中で PCR により増幅した。

PCR は、Taq ポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 94°C 0.5 分、56°C 1 分、72°C 1 分を 1 サイクルとし、20 サイクル反応し、10 倍に希釈した。このうち 2 μl を鋳型として、4.8 pmole の TIR + N プライマー (5' -TGTGCATTTTCTTGTAGN-3' (配列番号 : 7) N=A, C, G または T. 混合ではなく 4 種合成する。) と 4.8 pmole の MseI+N プライマー (5' -GATGAGTCCTGAGTAAN-3' , (配列番号 : 8) N=A, C, G または T. 混合ではなく 4 種合成する。5' 端をフルオロセインで標識 (アマシャムファルマシアバイオテク株式会社 Vistra fluorescence 5' -オリゴラベリングキットを使用) ) を用いて 20 μl 中で PCR を行った。

反応はそれぞれのプライマーの組み合わせで行うため 16 反応をおこなう。PCR は、94°C 0.5 分、65°C 1 分 (1 サイクルごとに 0.7 °C づつ下げる) 、72°C 1 分を 1 サイクルとし、13 サイクル反応し、さらに 94°C 0.5 分、56°C 1 分、72°C 1 分を 1 サイクルとし、13 サイクル反応した。同様の操作を Pr-r / Pr-r 株から得た染色体 DNA についても行い、DNA シークエンサー 377 (ピーアイバイオシステムズジャパン株式会社) のシークエンスゲルにて電気泳動を行い、FM BIOII (宝酒造株式会社) を用いてバンドを検出した。

Pr-r / Pr-r 株と pr-m / pr-m 株由来のバンドを比較したところ、約 130 bp の DNA 断片が pr-m を有する株に特異的に発現していた。この 130 bp の DNA 断片を回収し、20 pmole TIR プライマーと 20 pmole MseI プライマーを用いて PCR (94°C 0.5 分、56°C 1 分、72°C 1 分を 1 サイクルとし、30 サイクル反応) により増幅し、pGEM-T ベクター

(Promega Corporation) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。その配列は、

5'-TGAGCATTTCCTTGTAGTG CTGAGATTTCCCTCCATTGTCTGAAGCTCTCATCCTAACAC  
TACCCCCACATCTCACCTTCAAG GTCCAATCTTATCATTATCT TTACTCAGGACTCATCGTC-3'

(配列番号：9)

であった（1本下線部は使用したプライマー、2本下線はエクソン、その他はイントロンに対応）。配列番号：9に記載の配列をプローブとしてノザン解析を行ったところ、Pr-rを有するアサガオの蕾には約2.3kbの転写産物が存在したが、pr-m/pr-m株には対応する転写産物は存在しなかった。従って、この2.3kbの転写産物がPurple遺伝子に対応することがわかった。

#### 実施例4. cDNAの単離

野生株アサガオ(Pr-w/Pr-w)由来のcDNAライブラリー(Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p375)の約600万個クローンを130bpDNA断片をプローブとしてスクリーニングし、2クローンの陽性クローンを得た。そのうち1クローンは、2237 bpのcDNAを持ち、その中には1626bpからなるオープンリーディングフレームが見られた（配列番号：1）。予測されるアミノ酸配列は、酵母とアラビドプシスのNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>アンチポーター（それぞれNhxl, AtNhxl, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) Gaxiola et al. p1480 ~1485）に対して29.3%、73.4%の同一性を示した。

この結果からアサガオのPurple遺伝子はNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>アンチポーターをコードしていることが判明した。なお、アラビドプシスから得られたNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>アンチポーターは、酵母において耐塩性を与えるタンパク質として注目されているが、Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>アンチポーターと花の色との関連が見出されたのは今回が初めてである。

### 実施例 5. 酵母Na<sup>+</sup> - H<sup>+</sup> アンチポーター変異体の相補実験

アサガオのPurple遺伝子がコードする推定アミノ酸配列は、酵母やアラビドプシスのNa<sup>+</sup> - H<sup>+</sup> アンチポーターのそれに相同意がある。そこで実際に、アサガオPurple遺伝子産物が、Na<sup>+</sup> - H<sup>+</sup> アンチポーター蛋白として機能できるか酵母Na<sup>+</sup> - H<sup>+</sup> アンチポーター変異体を用いた相補実験で確認した。

まず最初に、以下の2種類のDNA断片を合成した。

CBSC1-Linker (22mer) 5' - CGA TAG ATC TGG GGG TCG ACA T -3'

(配列番号 : 12)

CSBC2-Linker (22mer) 5' - CGA TGT CGA CCC CCA GAT CTA T -3'

(配列番号 : 13)

この2つのDNA断片からは、Clal-BgIII-Sall-Clalという制限酵素部位をもつリンカーができる。pYES2ベクター(Invitrogen Corporation)のClal部位にBgIIIサイトがURA3遺伝子側に位置するよう定法にしたがって上記のリンカーを挿入し、プラスミドpINA145を作成した(図3)。プラスミドpJJ250(Jones and Prakash, 1990, Yeast, 6, 363-366)をBamHIとSallで消化して得られる2kbのDNA断片をBgIIIとSallで消化したプラスミドpINA145とライゲーションし、プラスミドpINA147を作成した(図4)。プラスミドpINA147のGAL1プロモーターの制御下にPurple cDNAを連結してプラスミドpINA151を作成した。pINA147およびpINA151をNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>アンチポーターの変異株である酵母R101株にそれぞれ形質転換した。酵母R101株はNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>アンチポーター遺伝子の変異により400mM NaCl添加APG培地(Nass et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 26145; Gaxiola et al., 1999, 96, 1480-1485)では生育できない。pINA147を形質転換したR101株も同様に生育できなかつたが、pINA151を形質転換したR101株のみ400mM NaCl添加APG培地でも生育が

可能であった。この結果から、アサガオPurple遺伝子産物は $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーター機能を有していることが明らかになった。

#### 実施例 6. 植物での発現ベクターの構築

アサガオPurple cDNA10ng を鋳型として、合成プライマーPR-5 (5'-GGGATCCAAACAAAAATGGCTGTGGGG-3') (配列番号：10) とPR-3 (5'-GGGTCGACTAAGCATAAAACATAGAGCC -3') (配列番号：11) を用いてPCRを行った。ポリメラーゼは、Taq ポリメラーゼ（東洋紡績株式会社）を使用し、95°C 45秒反応後、95°C 45秒、50°C 45秒、72°C 45秒を1サイクルとし、25サイクル反応し、さらに72度で10分反応した。得られた約1.6 kbのDNA断片をpCR2.1-Topo（クロントック株式会社）にライゲーションし、pCR-purpleとした。このプラスミド上のPurple cDNAの塩基配列にPCRによるエラーがないことを確認した。

pBE2113-GUS (Plant Cell Physiol. 37 (1996) Mitsuhara et al. p49) を SacI で消化し、平滑末端化した後、Xholリンカー（東洋紡績株式会社）を挿入し、得られたプラスミドをpBE2113-GUSxとした。これをEcoRI と HindIII で消化して得られる約2.7 kbのDNA断片をpBinPLUSのHidIIIとEcoRI 消化物と連結し、得られたプラスミドをpBEXP とした。

一方、pCGP484 (特表平8-511683号公報) を HindIII と XbaI で消化して得られる約1.2kb のDNA断片と、pCR-purpleをXbaI と SalI で消化して得られる約1.6kb のDNA断片と、pBEXP を HindII I と Xhol で消化して得られる約13kbのDNA断片をライゲーションし、pSPB607を得た(図1)。このプラスミドは、アグロバクテリウムによる植物の形質転換用のバイナリーベクターで、このプラスミド上で、Purple cDNA は、キンギョソウ由来カルコンシンターゼプロモーターと、アグロバクテリウム由来のノバリンシンターゼター

ミネーターの制御下にある。

また、pCGP669（特表平8-511683号公報）をHindIIIとBamHIで消化して得られる約0.8kbのDNA断片と、pCR-purpleをBamHIとSalIで消化して得られる約1.6kbのDNA断片と、pBEXPをHindIIIとXbaIで消化して得られる約13kbのDNA断片をライゲーションし、pSPB608を得た（図2）。このプラスミドは、アグロバクテリウムによる植物の形質転換用のバイナリーベクターで、このプラスミド上で、Purple cDNAは、ペチュニア由来カルコンシンターゼAプロモーターと、アグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼターミネーターの制御下にある。

このようにして得られた発現ベクターを用いて植物の形質転換を行うことにより、液胞のpHを制御し、花色を調節することができる。

#### 実施例7. Purple遺伝子のホモログの単離

ペチュニア（*Petunia hybrida* 品種 Old Glory Blue）、ニーレンベルギア（*Nierembergia hybrida* 品種NB 17）、トレニア（*Torenia hybrida* 品種サマーウエーブ・ブルー）の花弁由来cDNA libraryをcDNA synthesis kit (Stratagene USA) を用いてそれぞれ作成した。作成方法は、製造者の推奨する方法に従った。それぞれ約20万個のクローンを定法に従って、スクリーニングした。なお、メンブレンの洗浄には、5 x SSC, 0.1% SDS 水溶液を用い、50°Cで10分間、3回行った。得られた陽性クローンのうち、それぞれの最長クローンの塩基配列を決定した。ペチュニアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：14及び15に、ニーレンベルギアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：16及び17に、そしてトレニアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：18及び19に示す。ペチュニア、ニ

一レンベルギア及びトレニアのPurple遺伝子のホモログは、アサガオのPurple遺伝子に対してアミノ酸レベルでそれぞれ75%、76%及び71%の同一性を示した。

アサガオPurple遺伝子がコードする $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターとアラビドプシスのAtNhx\_1がコードする $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターのアミノ酸配列の同一性が約73%であることから、ここで得たペチュニア、ニーレンベルギア、トレニアのPurple遺伝子のホモログは、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ アンチポーターをコードしていると判断される。

#### 実施例 8. アサガオPurple 染色体クローンの単離

変異型アサガオ(pr-m/pr-m)と復帰型アサガオ(Pr-r/Pr-r)の染色体DNAをBglIIIで切断後、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、アサガオPurpleのcDNAをプローブにそれぞれゲノミックサザン解析を行った。その結果、変異型アサガオでは無く、復帰型アサガオには存在する約7.5kbのバンドを検出した。

野性型アサガオ(Pr-w/Pr-w、KKZSK2系統)の染色体DNA 50 $\mu\text{g}$ をBglIIIで切断後、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、約7~9kbの部分を切り出して GENECLEAN III KIT (BI0101) を用いてDNAを抽出した。このDNAを $\lambda$ Zap express vector (Stratagene USA)にライゲーションし、アサガオPurpleのcDNAをプローブとしてスクリーニングした。得られたポジティブクローンの塩基配列を決定したところ、この約7.5kbのDNA断片にPurpleのプロモーター上流約6.3kbとエキソン3の途中までの領域が存在した。この配列のうちPurple遺伝子の開始コドンまでの配列を配列番号：20に示す。

Purple遺伝子は、アサガオの開花約24時間前にのみ強く発現が誘導されること、また、5' - 非翻訳領域へのトランスポゾンの挿入により、Purple遺伝子の発現が抑制されることが判明している。このことから、得られたPurple遺伝子のプロモーター領域には、アサ

ガオ花弁で時期特異的、器官特異的にPurple遺伝子を発現させるために必要な因子を含んでいる。このプロモーター領域の下流に目的遺伝子を配置すれば、時期特異的、器官特異的に目的遺伝子の発現が制御できる。

### 産業上の利用可能性

本発明により得られた遺伝子が液胞のpHおよび花の色の調節に関わっていることがはじめて明らかとなった。また、本発明の遺伝子を花弁で発現することにより、液胞のpHを上昇させ、花の色を青く変化させることができる。また、本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、液胞のpHを低下させ、花の色を赤く変化させることができる。液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子としては、本発明において得られたアサガオ由來のものだけでなく、他の生物の同様な遺伝子も用いることができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 植物細胞の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
2. 配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する植物細胞の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
3. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して 1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／または他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
4. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して 20% 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。
5. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して 70% 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。
6. 配列番号：2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸の一部または全部に対して、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。
7. 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。
8. 請求項 7 記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
9. 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。
10. 請求項 8 記載の宿主細胞を培養し、又は生育させ、そして該宿主細胞から液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質を採取す

ることを特徴とする該蛋白質の製造方法。

11. 請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子、または請求項7記載のベクターが導入され形質転換された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織。

12. 請求項11に記載の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花。

13. 請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子、または請求項7記載のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、液胞のpHを制御する方法。

14. 請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子、または請求項7記載のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、植物体の花の色を調節する方法。



Fig. 1

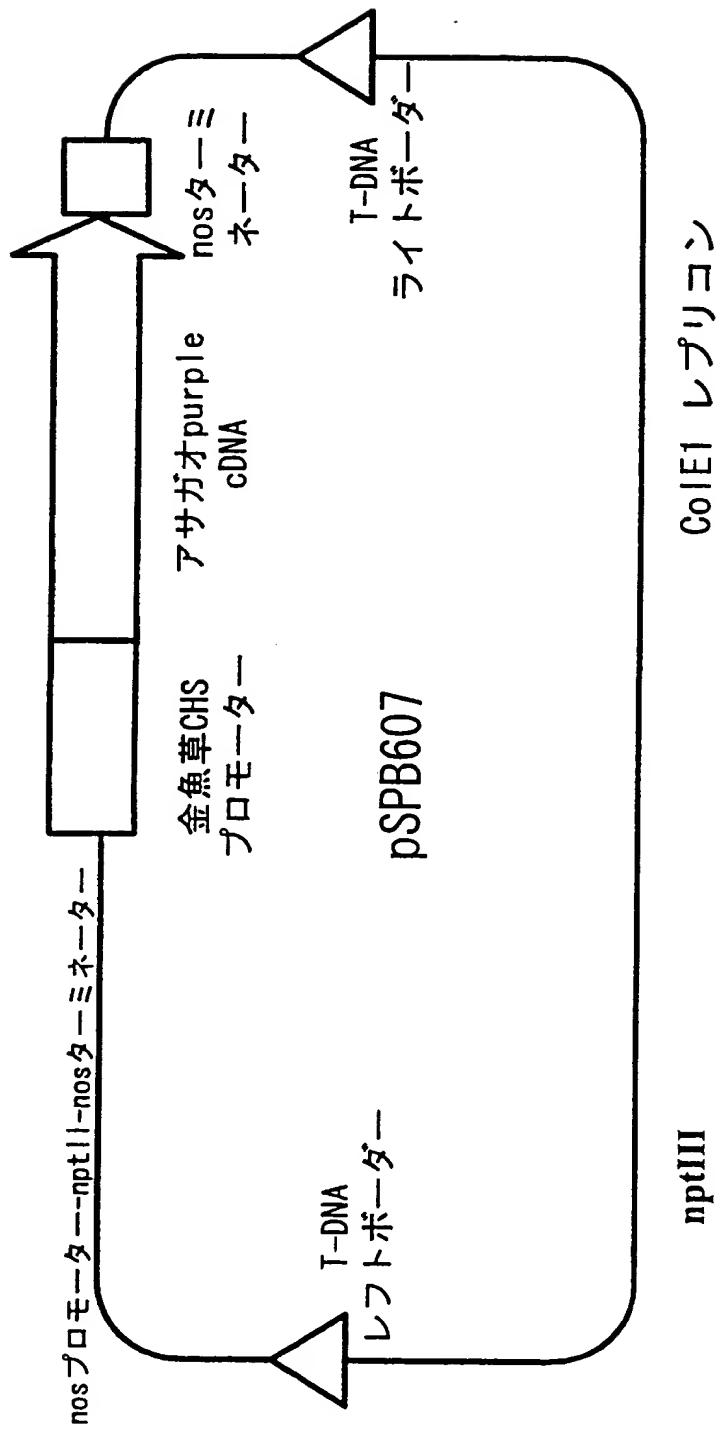




Fig. 2

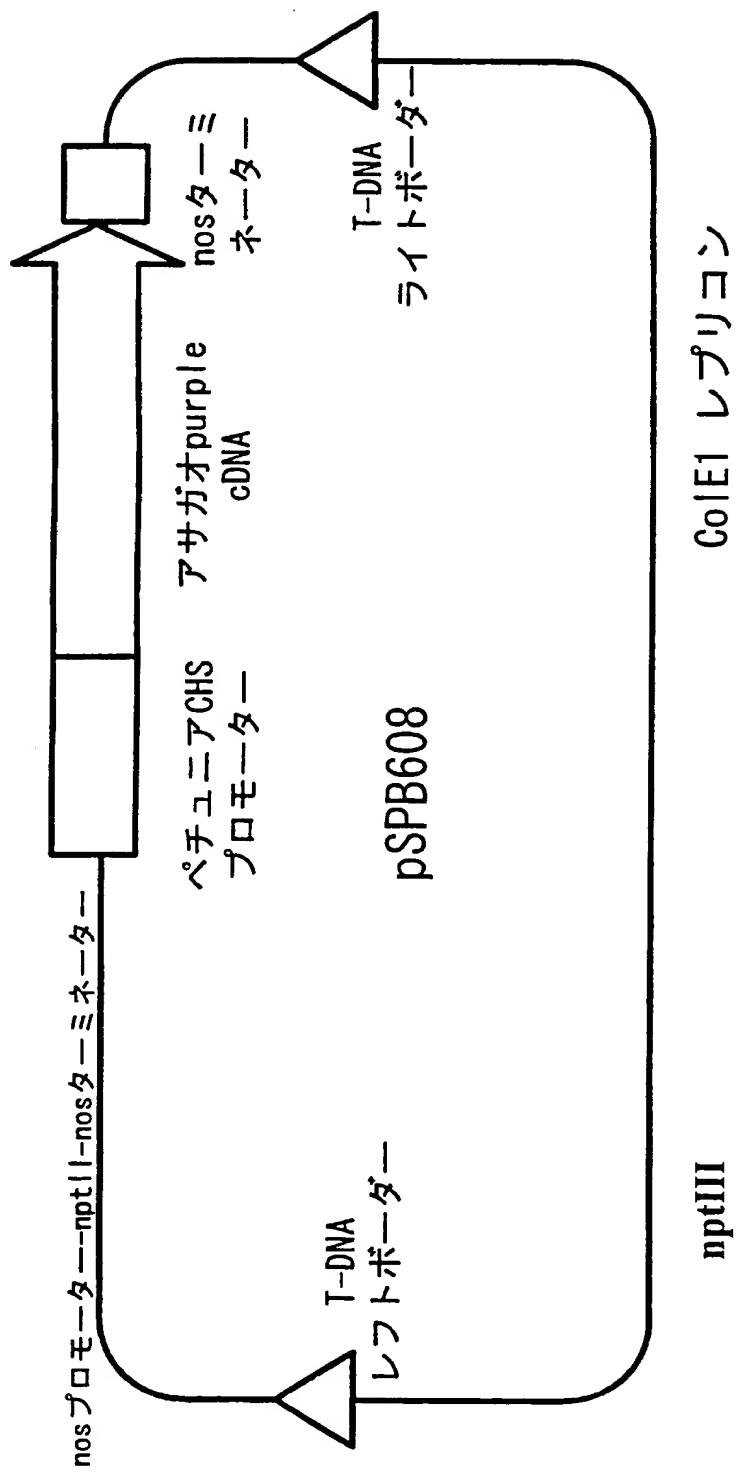




Fig.3

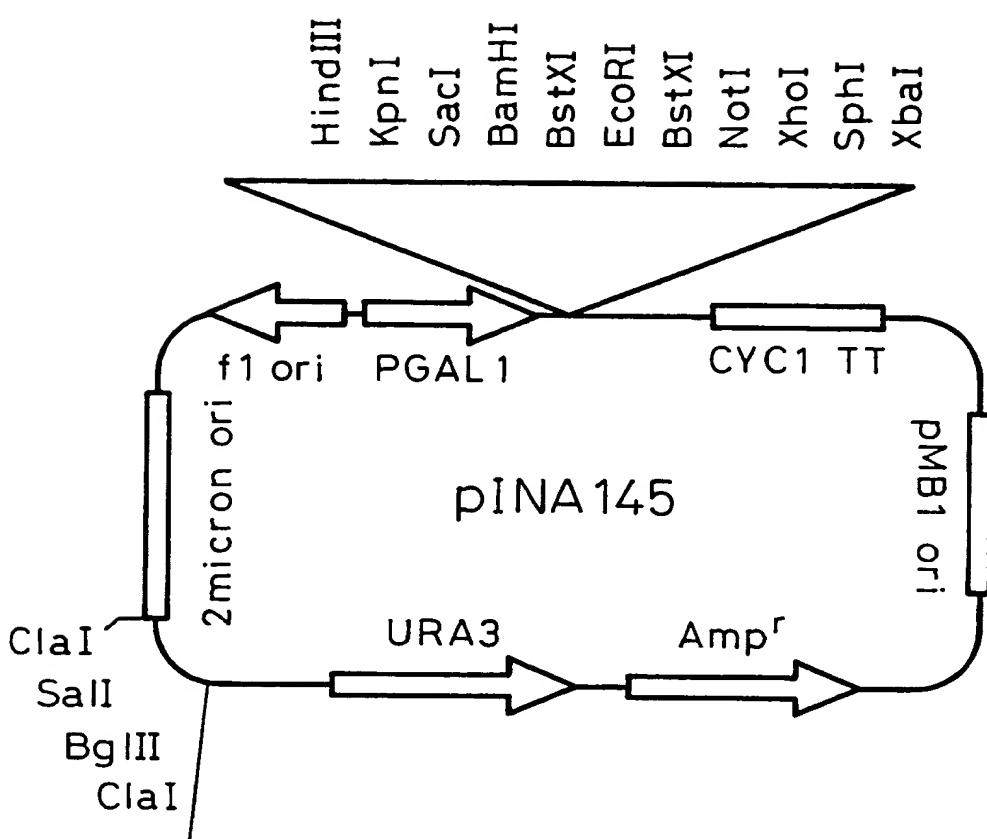
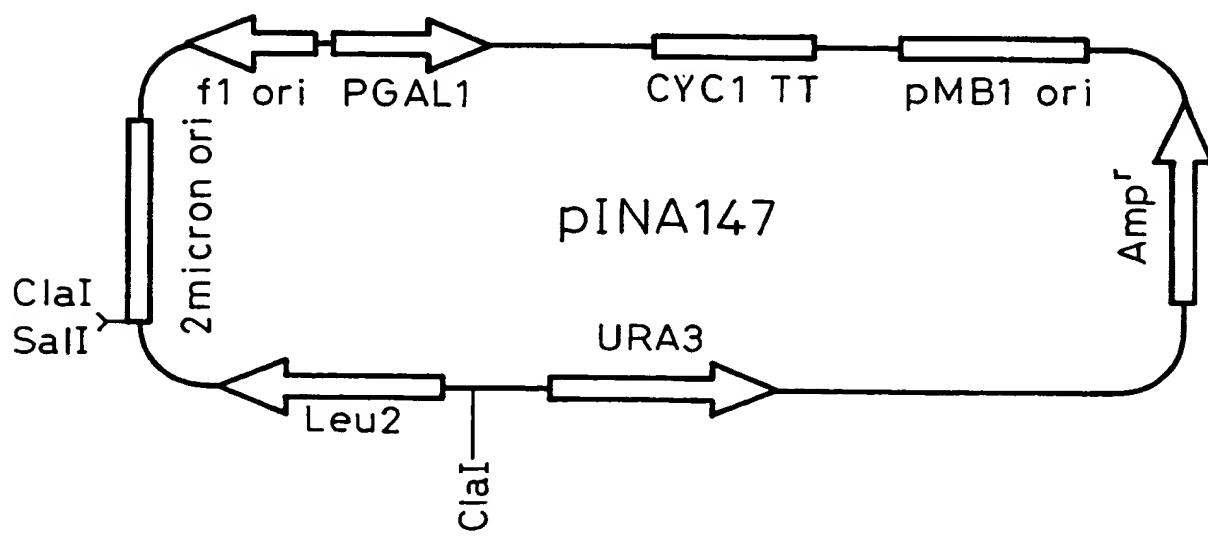


Fig.4





## SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > SUNTORY LIMITED  
< 1 2 0 > Gene coding for protein having an activity to control pH in vacuoles  
< 1 3 0 > 994020  
< 1 6 0 > 20  
< 2 1 0 > 1  
< 2 1 1 > 2237  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Ipomea nil  
< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein having an activity to control pH in vacuoles  
< 4 0 0 > 1

agaatgtagg ctacagaaat tttcagacag atagatacat aaatccgtat aatagagaca 60  
gagaaaacaga aaaagagaga gtcacgttaa tcctgagatt ttcctccatt tgtctgaagc 120  
tcttcatcct tcaacactac ccccacatct caccttcaa gtgatttgta tgtttcggg 180  
agggatttggaa atggcaacc cgatatgtg aacagaaacc acgacattgg gaaaagattt 240  
attgcaaaaa ttgtttgat tgtttgat tttgtggtag aaaaagggaa agaacaaaaa 299  
atg gcg ttc ggg ttg tct ttc ctc caa aat tcg gat ttg ttc acg 347  
Met Ala Phe Gly Leu Ser Ser Leu Leu Gln Asn Ser Asp Leu Phe Thr  
1 5 10 15  
tct gat cat gct tcc gtt gtg tcg atg aac ctc ttt gtg gcg ttg ctt 395  
Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Met Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu  
20 25 30  
tgc gca tgc att gtt ctt ggc cat cta ctc gag gag aat cgc tgg gtg 443  
Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val  
35 40 45



aac gaa tcc att act gcc ctt ata att ggt ttg tgc acc gga gtt gta	491		
Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val			
50	55	60	
att ttg ctc ctt agc gga gga aag agt tca cat ctt ctc gtc ttt agc	539		
Ile Leu Leu Leu Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser			
65	70	75	80
gaa gat ctt ttc ttt ata tat ctc ctg cca cct ata ata ttc aat gcg	587		
Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Phe Asn Ala			
85	90	95	
ggg ttt caa gtg aaa aag aag cag ttt ttc gtg aac ttc atg aca att	635		
Gly Phe Gln Val Lys Lys Gln Phe Phe Val Asn Phe Met Thr Ile			
100	105	110	
atg ctg ttt gga gct att ggc aca ctt att agc tgt tct att ata tca	683		
Met Leu Phe Gly Ala Ile Gly Thr Leu Ile Ser Cys Ser Ile Ile Ser			
115	120	125	
ttt ggt gcg gtc aaa att ttc aag cac tta gac att gac ttt ctg gat	731		
Phe Gly Ala Val Lys Ile Phe Lys His Leu Asp Ile Asp Phe Leu Asp			
130	135	140	
ttt gga gat tat tta gca att ggt gcg ata ttt gct gca acc gat tct	779		
Phe Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser			
145	150	155	160
gtt tgc aca ttg cag gtg ctc agt cag gat gag acg ccc cta ctt tac	827		
Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr			
165	170	175	
agt ctc gtg ttt gga gaa ggg gtc gtc aat gat gct aca tct gtg gtc	875		
Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val			
180	185	190	



ctt ttt aat gct att caa agt ttt gac atg act agt ttt gat cca aaa 923  
 Leu Phe Asn Ala Ile Gln Ser Phe Asp Met Thr Ser Phe Asp Pro Lys  
 195 200 205  
 att ggg ctt cat ttc att gga aac ttc ttg tat tta ttt ctc tcg agc 971  
 Ile Gly Leu His Phe Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Ser  
 210 215 220  
 act ttt ttg ggc gtg gga att gga ctg ctt tgt gct tat att atc aaa 1019  
 Thr Phe Leu Gly Val Gly Ile Gly Leu Leu Cys Ala Tyr Ile Ile Lys  
 225 230 235 240  
 aag cta tac ttt ggc agg cac tca acc gat cgt gag gtt gcc ctt atg 1067  
 Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met  
 245 250 255  
 atg ctc atg tct tac ttg tct tat ata atg gcc gag tta ttc tat cta 1115  
 Met Leu Met Ser Tyr Leu Ser Tyr Ile Met Ala Glu Leu Phe Tyr Leu  
 260 265 270  
 agc ggc ata ctt act gta ttc ttc tgt gga att gtc atg tct cat tat 1163  
 Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr  
 275 280 285  
 acc tgg cac aat gtt acc gag agc tca agg gtc act act agg cat tcc 1211  
 Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Arg His Ser  
 290 295 300  
 ttt gca act ctg tca ttt gtc gca gag aca ttt atc ttc ctc tat gtt 1259  
 Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Thr Phe Ile Phe Leu Tyr Val  
 305 310 315 320  
 ggt atg gat gcc ttg gat atc gag aaa tgg aaa ttt gtg aaa aat agt 1307  
 Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Lys Asn Ser  
 325 330 335



cag gga cta tca gtc gca gtg agc tca ata ttg gta ggc cta atc tta 1355  
 Gln Gly Leu Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Leu Val Gly Leu Ile Leu  
 340 345 350  
 gta ggc aga gct gcg ttc gta ttc ccc ttg tcg ttt tta tcc aac tta 1403  
 Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu  
 355 360 365  
 gca aag aaa aac tct tcg gac aag ata tcc ttt agg caa caa ata ata 1451  
 Ala Lys Lys Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ser Phe Arg Gln Gln Ile Ile  
 370 375 380  
 att tgg tgg gct ggc cta atg aga ggc gcc gtc tca ata gca ctt gcg 1499  
 Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala  
 385 390 395 400  
 tat aat aag ttt aca acc tcg ggg cat acg tca ttg cac gag aac gca 1547  
 Tyr Asn Lys Phe Thr Thr Ser Gly His Thr Ser Leu His Glu Asn Ala  
 405 410 415  
 ata atg att aca agt act gtt acg gtt ctg ttc agc aca gtt gta 1595  
 Ile Met Ile Thr Ser Thr Val Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val  
 420 425 430  
 ttc ggg ttg atg acg aag cct ctg ata aac ctt ctg cta ccc ccg cac 1643  
 Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Pro Pro His  
 435 440 445  
 aag cag atg cca agc ggt cat tcg tca atg aca aca tcc gaa ccc agt 1691  
 Lys Gln Met Pro Ser Gly His Ser Ser Met Thr Thr Ser Glu Pro Ser  
 450 455 460  
 agt ccg aag cac ttc acg gtg cca ctc ctg gac aac caa cct gac tca 1739  
 Ser Pro Lys His Phe Thr Val Pro Leu Leu Asp Asn Gln Pro Asp Ser  
 465 470 475 480



gaa agc gat atg ata acc gga cct gag gtt gct cga cca act gcc ttg 1787

Glu Ser Asp Met Ile Thr Gly Pro Glu Val Ala Arg Pro Thr Ala Leu

485

490

495

cgc atg ctg cta agg acg cca acc cac acc gtg cac cgc tac tgg cgt 1835

Arg Met Leu Leu Arg Thr Pro Thr His Thr Val His Arg Tyr Trp Arg

500

505

510

aag ttt gat gat tcg ttt atg cgt ccc gtg ttt ggc ggg cg gga ttc 1883

Lys Phe Asp Asp Ser Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe

515

520

525

gtt ccg ttt gtc gcg ggc tca cca gtt gag cag agc cct aga tga 1928

Val Pro Phe Val Ala Gly Ser Pro Val Glu Gln Ser Pro Arg

530

535

540

ggtacaaagt acaaacaaga cactgttgct gggtgaaata gtgttagtt tatcatagtt 1988

gattctggtt gccccttta tgaaatgggc tgggtgaaag tcttctcact agcttaggtt 2048

cattgcattt ctacttcata aatgtttat ttatatttgt aaatgttggt gcattttagg 2108

tacttgtatt aacacctcat ttgtacata ttatggta cagagtattt ttttatgaa 2168

acaataatgg ctgaatttac aatttggctc tatgtttga tgcttagtaa aaaaaaaaaa 2228

aaaaaaaaaa

2237

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 542

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Ipomea nil

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an  
activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 2

Met Ala Phe Gly Leu Ser Ser Leu Leu Gln Asn Ser Asp Leu Phe Thr

1

5

10

15



Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Met Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu

20	25	30
----	----	----

Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val

35	40	45
----	----	----

Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val

50	55	60
----	----	----

Ile Leu Leu Leu Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala

85	90	95
----	----	----

Gly Phe Gln Val Lys Lys Gln Phe Phe Val Asn Phe Met Thr Ile

100	105	110
-----	-----	-----

Met Leu Phe Gly Ala Ile Gly Thr Leu Ile Ser Cys Ser Ile Ile Ser

115	120	125
-----	-----	-----

Phe Gly Ala Val Lys Ile Phe Lys His Leu Asp Ile Asp Phe Leu Asp

130	135	140
-----	-----	-----

Phe Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr

165	170	175
-----	-----	-----

Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val

180	185	190
-----	-----	-----

Leu Phe Asn Ala Ile Gln Ser Phe Asp Met Thr Ser Phe Asp Pro Lys

195	200	205
-----	-----	-----

Ile Gly Leu His Phe Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Ser

210	215	220
-----	-----	-----



Thr Phe Leu Gly Val Gly Ile Gly Leu Leu Cys Ala Tyr Ile Ile Lys  
225 230 235 240  
Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met  
245 250 255  
Met Leu Met Ser Tyr Leu Ser Tyr Ile Met Ala Glu Leu Phe Tyr Leu  
260 265 270  
Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr  
275 280 285  
Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Arg His Ser  
290 295 300  
Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Thr Phe Ile Phe Leu Tyr Val  
305 310 315 320  
Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Lys Asn Ser  
325 330 335  
Gln Gly Leu Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Leu Val Gly Leu Ile Leu  
340 345 350  
Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu  
355 360 365  
Ala Lys Lys Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ser Phe Arg Gln Gln Ile Ile  
370 375 380  
Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala  
385 390 395 400  
Tyr Asn Lys Phe Thr Thr Ser Gly His Thr Ser Leu His Glu Asn Ala  
405 410 415  
Ile Met Ile Thr Ser Thr Val Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val  
420 425 430



Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Leu Pro Pro His

435 440 445

Lys Gln Met Pro Ser Gly His Ser Ser Met Thr Thr Ser Glu Pro Ser

450 455 460

Ser Pro Lys His Phe Thr Val Pro Leu Leu Asp Asn Gln Pro Asp Ser

465 470 475 480

Glu Ser Asp Met Ile Thr Gly Pro Glu Val Ala Arg Pro Thr Ala Leu

485 490 495

Arg Met Leu Leu Arg Thr Pro Thr His Thr Val His Arg Tyr Trp Arg

500 505 510

Lys Phe Asp Asp Ser Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe

515 520 525

Val Pro Phe Val Ala Gly Ser Pro Val Glu Gln Ser Pro Arg

530 535 540

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 16

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI adaptor

< 4 0 0 > 3

gacgatgagt cctgag 16

< 2 1 0 > 4

< 2 1 1 > 14

< 2 1 2 > DNA



< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI adaptor

< 4 0 0 > 4

tactcaggac tcat 14

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 20

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > TIR primer

< 4 0 0 > 5

tgtgcatttt tcttgtatgt 20

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 16

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI primer

< 4 0 0 > 6

gatgagtcct gagtaa 16



< 2 1 0 > 7  
< 2 1 1 > 19  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 1 >  
< 2 2 2 >  
< 2 2 3 > TIR+N primer  
< 4 0 0 > 7

tgtgcattt tcttgtagn 19

< 2 1 0 > 8  
< 2 1 1 > 17  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 1 >  
< 2 2 2 >  
< 2 2 3 > MseI+N primer  
< 4 0 0 > 8

gatgagtcct gagtaan 17

< 2 1 0 > 9  
< 2 1 1 > 130  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 1 >  
< 2 2 2 >



< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 9

tgagcattt tcttgtatg ctgagattt cctccattt tctgaagctc ttcatccttc 60

aacactaccc ccacatctca ccttcaagg tccaatctt atcattcatc tttactcagg 120

actcatcgta 130

< 2 1 0 > 10

< 2 1 1 > 26

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > PR-5 primer

< 4 0 0 > 10

gggatccaac aaaaatggct gtcggg 26

< 2 1 0 > 11

< 2 1 1 > 29

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > PR-3 primer

< 4 0 0 > 11

gggtcgacta agcataaaa catagagcc 29

< 2 1 0 > 12

< 2 1 1 > 22



< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 1 >  
< 2 2 2 >  
< 2 2 3 > CBSC1-linker  
< 4 0 0 > 12  
cgatagatct ggggtcgac at 22  
< 2 1 0 > 13  
< 2 1 1 > 22  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 1 >  
< 2 2 2 >  
< 2 2 3 > CBSC2-linker  
< 4 0 0 > 13  
cgatgtcgac cccagatct at 22  
< 2 1 0 > 14  
< 2 1 1 > 2423  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Petunia hybrida  
< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein  
having an activity to control pH in vacuoles  
< 4 0 0 > 14  
attgcgccttc gtatttact gctgaatgaa atcgtgttt tttattcagt tcgttgttat 60  
taatttcaga gttttttta ttaaagggtgt gtttggttga agaaattgta tttgctgaat 120



tttgcagaag	ttttgagtt	tttgctaaac	tattgtgaga	tctgatttg	aattttcca	180										
gtggtgtttt	aagctcaatt	cgacgtcggt	tttactggaa	ttctgtatcg	taaataggc	240										
tattttgatg	taaggttgtg	aaagttaca	gttggaaagt	ttagtttagtg	aaaaagggga	300										
aactttattg	tgatatttc	acaagtattt	ggtgaattca	ggttattgag	a atg gct	357										
						Met Ala										
ttt gat ttt	ggg acg ttg	ttg gga aat	gta gac agg	tta tcg aca tct		405										
Phe	Asp	Phe	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Thr	Ser	
5				10						15						
gat cat caa tca	gtt gtg tcg	ata aac tta	ttc gtt gct	ctt att tgc												453
Asp	His	Gln	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Asn	Leu	Phe	Val	Ala	Leu	Ile	Cys	
20				25						30						
gcg tgt att	gtg atc ggt	cat ttg ttg	gaa gaa aac	aga tgg atg	aat											501
Ala	Cys	Ile	Val	Ile	Gly	His	Leu	Leu	Glu	Glu	Asn	Arg	Trp	Met	Asn	
35				40						45					50	
gag tcc ata act	gcc tta	gtg att ggt	tct tgt	act gga	atc gtt	att										549
Glu	Ser	Ile	Thr	Ala	Leu	Val	Ile	Gly	Ser	Cys	Thr	Gly	Ile	Val	Ile	
55					60						65					
cta ctg ata agt	gga gga aag	aac tct cat	att tta	gtg ttc	agt gaa											597
Leu	Leu	Ile	Ser	Gly	Gly	Lys	Asn	Ser	His	Ile	Leu	Val	Phe	Ser	Glu	
70					75						80					
gat ctt ttc	ttc att tac	ctt ctt ccg	cca atc	att ttt	aat gct	ggg										645
Asp	Leu	Phe	Phe	Ile	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ile	Ile	Phe	Asn	Ala	Gly	
85					90						95					
ttc cag gtg	aaa aag	aaa tcg	ttc ttc	cgc aat	ttc	agc	act	atc	atc	atg						693
Phe	Gln	Val	Lys	Lys	Ser	Phe	Phe	Arg	Asn	Phe	Ser	Thr	Ile	Met		
100					105						110					



ctc ttt ggg gca ctt ggc acc ttg ata tca ttc att att ata tca tta			741
Leu Phe Gly Ala Leu Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ser Leu			
115	120	125	130
ggt gcc att ggc att ttc aag aaa atg aat att gga agc ctt gaa att			789
Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asn Ile Gly Ser Leu Glu Ile			
135	140	145	
gga gat tac ctt gca att ggg gca atc ttc tct gct aca gat tct gta			837
Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser Val			
150	155	160	
tgc acc tta caa gtg ctt aat cag gat gaa aca ccc tta ttg tac agt			885
Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser			
165	170	175	
cta gtt ttt ggg gaa ggt gtt gtg aat gat gcc aca tct gta gtt ctg			933
Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val Leu			
180	185	190	
ttc aat gct atc cag aac ttt gac tta tct cac atc gac acg ggc aaa			981
Phe Asn Ala Ile Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Asp Thr Gly Lys			
195	200	205	210
gct atg gaa tta gtt gga aac ttt cta tac ttg ttt gcc tca agc act			1029
Ala Met Glu Leu Val Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser Ser Thr			
215	220	225	
gcc cta gga gtt gct gct ggc cta ctg agc gcc tat att att aaa aaa			1077
Ala Leu Gly Val Ala Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys Lys			
230	235	240	
ctc tac ttt gga agg cac tca act gac cgt gag gtt gct ata atg ata			1125
Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile Met Ile			
245	250	255	



ctc atg gct tac cta tct tac atg ctt gct gaa tta ttc tat tta agt	1173		
Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr Leu Ser			
260	265	270	
gca atc ctc act gtg ttt ttc tct ggg atc gtg atg tct cac tac acc	1221		
Ala Ile Leu Thr Val Phe Phe Ser Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr			
275	280	285	290
tgg cat aat gtg act gag agc tcg aga gtc act acc aag cac act ttt	1269		
Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Thr Phe			
295	300	305	
gct aca tta tca ttt att gct gaa ata ttc ata ttc ctt tat gtt ggt	1317		
Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr Val Gly			
310	315	320	
atg gat gct ttg gac att gag aag tgg aag ttt gta agc gac agc cct	1365		
Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp Ser Pro			
325	330	335	
gga ata tca gtt cag gtt agc tca ata ttg ctg ggt ctt gtt ttg gtt	1413		
Gly Ile Ser Val Gln Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu Val			
340	345	350	
gga aga gca gca ttt gtt ttc cca ttg tca ttc ttg tcc aac ttg acc	1461		
Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Thr			
355	360	365	370
aag aaa act cca gag gcg aaa att agt ttt aac cag cag gtt aca ata	1509		
Lys Lys Thr Pro Glu Ala Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val Thr Ile			
375	380	385	
tgg tgg gct gga ctt atg aga ggt gcc gtt tct atg gcc ctt gct tat	1557		
Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu Ala Tyr			
390	395	400	



aat cag ttt acc agg gga ggt cat act cag tta cgc gca aat gca ata 1605  
 Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn Ala Ile  
 405 410 415  
 atg atc aca agt act atc act gtt gtc ctt ttc agc aca gtc gtg ttt 1653  
 Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val Phe  
 420 425 430  
 ggg ttg atg aca aaa cct ttg att aga ata ttg cta ccc tca cac aaa 1701  
 Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Ile Leu Leu Pro Ser His Lys  
 435 440 445 450  
 cac ttg agc aga atg atc tct tct gaa cca acg acc cca aaa tcc ttc 1749  
 His Leu Ser Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Thr Thr Pro Lys Ser Phe  
 455 460 465  
 att gtg cca ctt ctt gac agc aca caa gac tca gaa gct gat ctg gaa 1797  
 Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp Leu Glu  
 470 475 480  
 cgc cat gta ccc cgt ccc cac agt ttg cgg atg ctc ctt tca acc cca 1845  
 Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser Thr Pro  
 485 490 495  
 tct cat aca gtg cat tat tac tgg aga aag ttt gac aat gca ttc atg 1893  
 Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met  
 500 505 510  
 cgt cca gtt ttc ggt gga cga ggt ttt gta cct ttt gct cca gga tca 1941  
 Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ala Pro Gly Ser  
 515 520 525 530  
 ccg aca gac cca gtt ggt gga aat ttg caa tgatggagat acagattgca 1991  
 Pro Thr Asp Pro Val Gly Gly Asn Leu Gln  
 535 540



aaaagtggc ttggtgaggg aagagggcag tttttggta atgaggttcc gttttctta 2051  
 atgttaatag caagtgtggt taaaaagggg ttgtctagtt tataggttt gcagatctca 2111  
 agtatattca ttgggtgat catgtttca gctcagttat tgctttggc cattgctgac 2171  
 catcaatttc tgtgggaat tcctatacggtt tttctcccta acagttctt tcttcatctt 2231  
 tttgcaattt atcgaaacac caaatgggtg tatattctgt aagcttgtgg catacgtagc 2291  
 ttaattgtct tgtaaaattt cctacagggtt agagattggc tcttgatatg tagatttcat 2351  
 atgattgtaa cattcccatt tctcagaaaa gaaactataa tataaaattt ctgggtggctg 2411  
 tcgccccgtgc tc 2423

< 2 1 0 > 15

< 2 1 1 > 540

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Petunia hybrida

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 15

Met Ala Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Asn Val Asp Arg Leu Ser

5	10	15
---	----	----

Thr Ser Asp His Gln Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu

20	25	30
----	----	----

Ile Cys Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp

35	40	45
----	----	----

Met Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Ile

50	55	60
----	----	----

Val Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn

85	90	95
----	----	----



Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Ile Met Leu Phe Gly Ala Leu Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Leu Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asn Ile Gly Ser Leu

130	135	140
-----	-----	-----

Glu Ile Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu

165	170	175
-----	-----	-----

Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val

180	185	190
-----	-----	-----

Val Leu Phe Asn Ala Ile Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Asp Thr

195	200	205
-----	-----	-----

Gly Lys Ala Met Glu Leu Val Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser

210	215	220
-----	-----	-----

Ser Thr Ala Leu Gly Val Ala Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile

245	250	255
-----	-----	-----

Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr

260	265	270
-----	-----	-----

Leu Ser Ala Ile Leu Thr Val Phe Phe Ser Gly Ile Val Met Ser His

275	280	285
-----	-----	-----

Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His

290	295	300
-----	-----	-----



Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr  
305 310 315 320  
Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp  
325 330 335  
Ser Pro Gly Ile Ser Val Gln Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val  
340 345 350  
Leu Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn  
355 360 365  
Leu Thr Lys Lys Thr Pro Glu Ala Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val  
370 375 380  
Thr Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu  
385 390 395 400  
Ala Tyr Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn  
405 410 415  
Ala Ile Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val  
420 425 430  
Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Ile Leu Leu Pro Ser  
435 440 445  
His Lys His Leu Ser Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Thr Thr Pro Lys  
450 455 460  
Ser Phe Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp  
465 470 475 480  
Leu Glu Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser  
485 490 495  
Thr Pro Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala  
500 505 510



Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ala Pro

515 520 525

Gly Ser Pro Thr Asp Pro Val Gly Gly Asn Leu Gln

530 535 540

< 2 1 0 > 16

< 2 1 1 > 2553

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Nierembergia hybrida

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein  
having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 16

aattattatt atttctctcc aactctcatt tctcagttg ttgtgacttt ttcagagctt 60

gaagttcagt taattcattt tccaatatat tgattgttt catttgagcg cgagaggatt 120

tctgtttctc aatctgcttt caaatccttt ttgtttgtga tattcgatat tattcactca 180

gtttacacctta atatttcctc gcactttctg aattcgagtgc ttgtggattt 240

cggaaaacgg aagaaaaattc agcaaaaacg ctgttgctga atttgcagca gtttgagttt 300

ttgctaaata gctaagatct gattgaattt ttcactggtg cttataggga aattcgacgt 360

cgttttgact gcaatatttgc tccgtgattt ggactttgtt gaaattttgc tatttgaat 420

ttgaatgtaa ggttgtcata gctttgccac tcggaaatac agtcagttagaa aagaaaaaaa 480

aactgtgttag tgtttttcc acaagtattt ggtgaatttgc gtttcttgc atg gcg 536

Met Ala

ttt gac ttt ggg act ctg ctg gga aag atg aac aac tta aca act tct 584

Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Lys Met Asn Asn Leu Thr Thr Ser

5 10 15

gat cat caa tca gtg gtg tcg gta aac ttg ttt gtt gca ctt att tgc 632

Asp His Gln Ser Val Val Ser Val Asn Leu Phe Val Ala Leu Ile Cys

20 25 30



gct tgt att gtg atc ggt cat tta ttg gag gaa aac aga tgg atg aat			680
Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Met Asn			
35	40	45	50
gag tcc ata act gcc ctt gtg att ggt agt tgc act gga gtc atc att			728
Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Val Ile Ile			
55	60		65
cta cta ata agt gga gga aag aac tca cat att tta gtg ttc agc gaa			776
Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe Ser Glu			
70	75		80
gat ctt ttc ttc att tac ctt ctt cca ccg atc att ttt aat gct ggg			824
Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly			
85	90		95
ttc cag gtg aaa aag aaa tca ttc ttc cgc aat ttc agt act atc atg			872
Phe Gln Val Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr Ile Met			
100	105		110
ctc ttt ggg gca gtt ggc acc ttg ata tcg ttc att att ata tca gcg			920
Leu Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile Ser Ala			
115	120	125	130
ggt gct att ggc att ttc aag aaa atg gat att gga cac ctt gaa att			968
Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asp Ile Gly His Leu Glu Ile			
135	140		145
gga gat tac ctt gca att gga gca atc ttt gct gca aca gat tct gta			1016
Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Val			
150	155		160
tgc acc tta caa gtg ctt aat cag gaa gaa aca ccg tta ttg tac agt			1064
Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Glu Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser			
165	170		175



ctt	gtg	ttt	gga	gaa	ggt	gtt	gtg	aat	gat	gcc	aca	tct	gta	gtg	ctg		1112
Leu	Val	Phe	Gly	Glu	Gly	Val	Val	Asn	Asp	Ala	Thr	Ser	Val	Val	Leu		
180			185							190							
ttc	aat	gct	gtc	cag	aac	ttt	gac	tta	tct	cat	atc	agc	aca	ggc	aaa		1160
Phe	Asn	Ala	Val	Gln	Asn	Phe	Asp	Leu	Ser	His	Ile	Ser	Thr	Gly	Lys		
195			200						205			210					
gct	ctg	caa	tta	att	gga	aac	ttt	cta	tac	ttg	ttt	gcc	tcg	agc	act		1208
Ala	Leu	Gln	Leu	Ile	Gly	Asn	Phe	Leu	Tyr	Leu	Phe	Ala	Ser	Ser	Thr		
215				220						225							
ttc	cta	ggg	gtt	gct	gtt	ggc	cta	cta	agt	gcc	ttt	ata	att	aag	aaa		1256
Phe	Leu	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Phe	Ile	Ile	Lys	Lys		
230				235						240							
ctc	tac	ttt	gga	agg	cac	tcg	act	gat	cgt	gag	gtt	gct	ata	atg	ata		1304
Leu	Tyr	Phe	Gly	Arg	His	Ser	Thr	Asp	Arg	Glu	Val	Ala	Ile	Met	Ile		
245				250						255							
ctc	atg	gcg	tac	cta	tca	tac	atg	ctt	gct	gaa	tta	ttc	tat	tta	agt		1352
Leu	Met	Ala	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Met	Leu	Ala	Glu	Leu	Phe	Tyr	Leu	Ser		
260			265						270								
gga	atc	ctc	act	gtg	ttt	ttc	tgt	ggg	atc	gtg	atg	tct	cac	tat	acc		1400
Gly	Ile	Leu	Thr	Val	Phe	Phe	Cys	Gly	Ile	Val	Met	Ser	His	Tyr	Thr		
275			280						285			290					
tgg	cat	aat	gtg	act	gag	agc	tca	aga	gtc	act	acc	aag	cac	acg	ttt		1448
Trp	His	Asn	Val	Thr	Glu	Ser	Ser	Arg	Val	Thr	Thr	Lys	His	Thr	Phe		
295					300						305						
gct	aca	tta	tca	ttt	att	gct	gaa	ata	ttc	ata	ttc	ctt	tat	gtt	ggt		1496
Ala	Thr	Leu	Ser	Phe	Ile	Ala	Glu	Ile	Phe	Ile	Phe	Leu	Tyr	Val	Gly		
310				315						320							



atg gat gct ttg gac att gag aag tgg aag ttt gta agc gac agc ccc 1544  
 Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp Ser Pro  
 325 330 335  
 gga aca tca att aag gtc agc tca att ctg cta ggt ctt gtt ttg gtt 1592  
 Gly Thr Ser Ile Lys Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu Val  
 340 345 350  
 gga agg gga gcc ttt gtt ttc ccc ttg tca ttc ttg tcc aac ttg acc 1640  
 Gly Arg Gly Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Thr  
 355 360 365 370  
 aag aaa aat cct gag gac aag att agc ttt aac cag cag gtt aca ata 1688  
 Lys Lys Asn Pro Glu Asp Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val Thr Ile  
 375 380 385  
 tgg tgg gct ggg ctt atg cga ggt gct gtt tct atg gcc ctt gct tat 1736  
 Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu Ala Tyr  
 390 395 400  
 aat cag ttt acc agg gga ggt cat act cag tta cgt gcc aat gca ata 1784  
 Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn Ala Ile  
 405 410 415  
 atg atc acg agt act atc act gtt gtc ctt ttc agc aca gtg gta ttt 1832  
 Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val Phe  
 420 425 430  
 ggg ttg atg aca aaa cct tta att cta tta ttg cta ccc tca caa aaa 1880  
 Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Leu Leu Leu Pro Ser Gln Lys  
 435 440 445 450  
 cac ttg atc aga atg atc tcc tct gaa ccg atg act cca aaa tcc ttc 1928  
 His Leu Ile Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Met Thr Pro Lys Ser Phe  
 455 460 465



att gtg cca ctt ctt gac agc aca caa gac tca gaa gct gat ctg ggc		1976	
Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp Leu Gly			
470	475	480	
cga cat gta ccc cgt ccc cac agt ttg cggt atg ctc ctg tca acc cca		2024	
Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser Thr Pro			
485	490	495	
tct cac acg gta cat tac tac tgg aga aaa ttt gac aat gca ttc atg		2072	
Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met			
500	505	510	
cgt cct gtt ttc ggt gga cga ggt ttt gta cct ttt gtt cca gga tca		2120	
Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Val Pro Gly Ser			
515	520	525	530
cct act gaa ccg gtc gaa ccg acc gaa cca aga cca gcc gaa tca aga		2168	
Pro Thr Glu Pro Val Glu Pro Thr Glu Pro Arg Pro Ala Glu Ser Arg			
535	540	545	
cca acc gaa cca act gat gag tgattacact gatggagatg caggttgcac		2219	
Pro Thr Glu Pro Thr Asp Glu			
550			
taaagtccca ctggccttgg agaaggacga aggcatggg ttgggtttga gggtttgttt		2279	
actgttaata gtttcgaat gtggtaaaa aagggttgc tagttttat atataggtcg		2339	
cagatacgtt atttcagctc agttcccgag gtgaaccct tagaggttt cttcctgacg		2399	
gtttttcttc tttttgtaa ttatcaaaa acaccaaatg ggttatatt cttaagctt		2459	
gttagcttaat taccttataa gcatgtggta gcgttcgtgt aatatgtaaa atttccattg		2519	
ccagaaaaaga aacttccata caatatttct gccg		2553	
< 2 1 0 > 17			
< 2 1 1 > 553			
< 2 1 2 > PRT			



< 2 1 3 > Nierembergia hybrida

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 17

Met Ala Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Lys Met Asn Asn Leu Thr

5

10

15

Thr Ser Asp His Gln Ser Val Val Ser Val Asn Leu Phe Val Ala Leu

20

25

30

Ile Cys Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp

35

40

45

Met Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Val

50

55

60

Ile Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe

65

70

75

80

Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn

85

90

95

Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr

100

105

110

Ile Met Leu Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile

115

120

125

Ser Ala Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asp Ile Gly His Leu

130

135

140

Glu Ile Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp

145

150

155

160

Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Glu Glu Thr Pro Leu Leu

165

170

175



Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val

180 185 190

Val Leu Phe Asn Ala Val Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Ser Thr

195 200 205

Gly Lys Ala Leu Gln Leu Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser

210 215 220

Ser Thr Phe Leu Gly Val Ala Val Gly Leu Leu Ser Ala Phe Ile Ile

225 230 235 240

Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile

245 250 255

Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr

260 265 270

Leu Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His

275 280 285

Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His

290 295 300

Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr

305 310 315 320

Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp

325 330 335

Ser Pro Gly Thr Ser Ile Lys Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val

340 345 350

Leu Val Gly Arg Gly Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn

355 360 365

Leu Thr Lys Lys Asn Pro Glu Asp Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val

370 375 380



Thr Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu  
385 390 395 400  
Ala Tyr Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn  
405 410 415  
Ala Ile Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val  
420 425 430  
Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Leu Leu Leu Pro Ser  
435 440 445  
Gln Lys His Leu Ile Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Met Thr Pro Lys  
450 455 460  
Ser Phe Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp  
465 470 475 480  
Leu Gly Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser  
485 490 495  
Thr Pro Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala  
500 505 510  
Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Val Pro  
515 520 525  
Gly Ser Pro Thr Glu Pro Val Glu Pro Thr Glu Pro Arg Pro Ala Glu  
530 535 540  
Ser Arg Pro Thr Glu Pro Thr Asp Glu  
545 550  
< 2 1 0 > 18  
< 2 1 1 > 2361  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Torenia hybrida  
< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein



having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 18

gttggagatt ccgagctgca gcatcacctt gcttatgtaa gctttaaaag tatcagaatt	60
gaatatcgac cactggaaag tgtttagga ctggattct tatctattga gcttggttga	120
aggtaaaaaa aggctcgatc tcgttcctct atagttggtt ttctggagtt gcaagcgact	180
ctactcgaa tctttccg cttattgga agctctgctt tactaaaaaa agtttgtctt	240
tttatctctg attcatcata aaatctgcgg gagattcaga agcggagatc tggtgcccag	300
agcaggagtt tcaactttga gcccgtttat attataaac aaattccgag tccaaagatt	360
gaactttgaa ataatcaaataatcaagcaa gcaat atg ggg ttt gaa tct gta	413

Met Gly Phe Glu Ser Val

5

att aag cta gcg gca agt gaa act gac aat ttg tgg agc tct ggt cac	461
Ile Lys Leu Ala Ala Ser Glu Thr Asp Asn Leu Trp Ser Ser Gly His	

10 15 20

ggt tca gtg gtc gct ata acc tta ttt gtc act ctt ctc tgc aca tgt	509
Gly Ser Val Val Ala Ile Thr Leu Phe Val Thr Leu Leu Cys Thr Cys	

25 30 35

ata gtg att ggt cat ctt ctg gag gaa aac cgt tgg atg aat gaa tct	557
Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Met Asn Glu Ser	

40 45 50

atc att gcc ctc ata att ggt tta gcc acg gga gtt ata atc ctg tta	605
Ile Ile Ala Leu Ile Ile Gly Leu Ala Thr Gly Val Ile Ile Leu Leu	

55 60 65 70

ata agt ggt gga aaa agc tcc cat ctc ttg gtg ttc agt gag gat ctt	653
Ile Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser Glu Asp Leu	

75 80 85



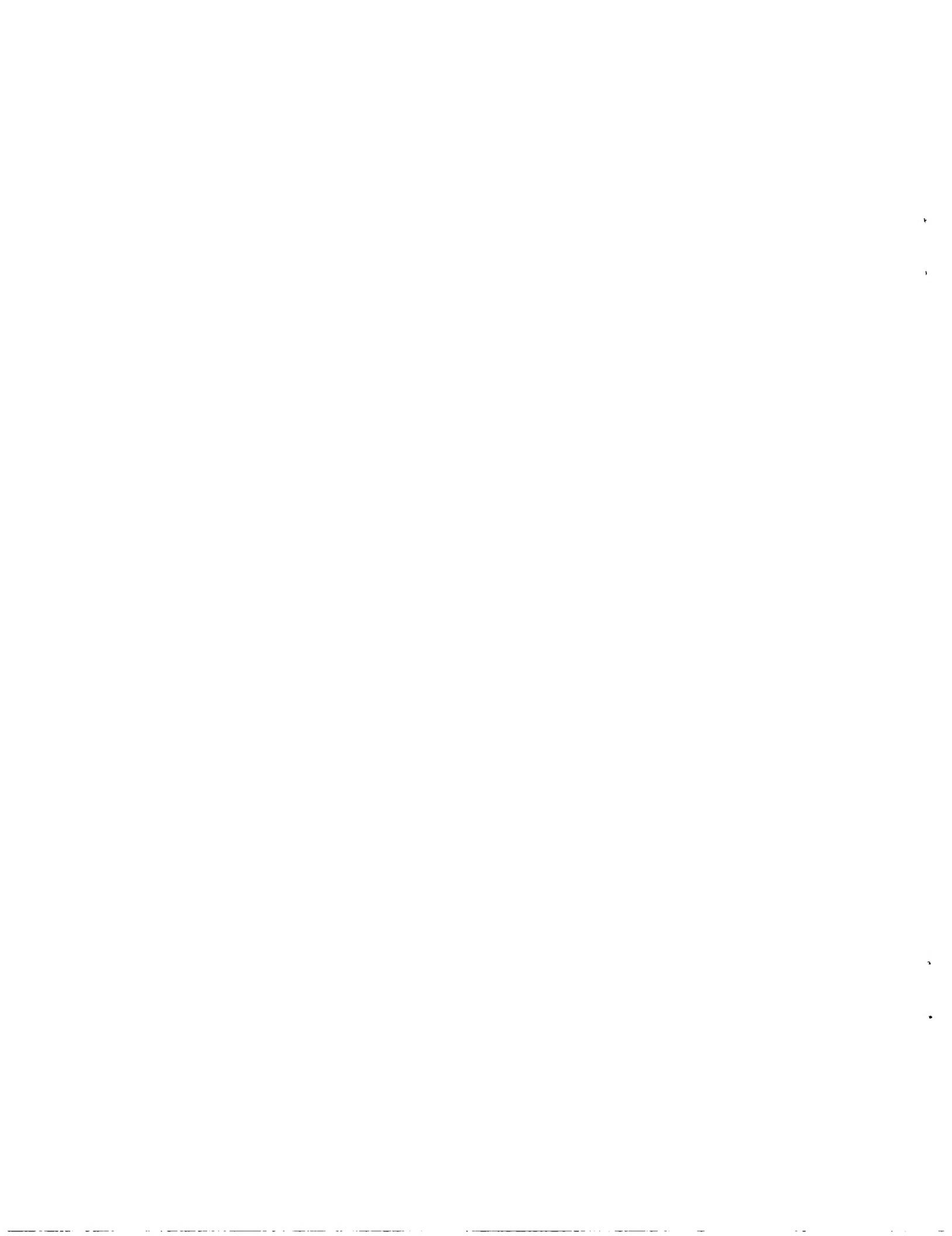
ttc ttc atc tat gcg ctg cca cca atc att ttt aat gcg ggg ttc caa	701		
Phe Phe Ile Tyr Ala Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly Phe Gln			
90	95	100	
gta aaa aag aaa tca ttc ttt cgc aat ttc gca act ata atg atg ttt	749		
Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ala Thr Ile Met Met Phe			
105	110	115	
gga gca gtt ggt acc ttg ata tcc ttc atc atc att tca ctc ggt aca	797		
Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile Ser Leu Gly Thr			
120	125	130	
att gca ttc ttc ccc aaa atg aac atg aga ctt gga gtt gga gat tat	845		
Ile Ala Phe Phe Pro Lys Met Asn Met Arg Leu Gly Val Gly Asp Tyr			
135	140	145	150
ctt gct att gga gct att ttt gct gca aca gac tca gtt tgc aca tta	893		
Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Val Cys Thr Leu			
155	160	165	
cag gtg cta agc cag gac gaa aca cca ctg ttg tac agt cta gtg ttt	941		
Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser Leu Val Phe			
170	175	180	
ggc gag ggt gtt gta aat gac gcg act tca gtg gtc cta ttt aat gca	989		
Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val Leu Phe Asn Ala			
185	190	195	
gta cag aac ttc gac ctg cct cat atg tct act gct aaa gct ttc gag	1037		
Val Gln Asn Phe Asp Leu Pro His Met Ser Thr Ala Lys Ala Phe Glu			
200	205	210	
ctt gtt gga aac ttc ttt tat tta ttt gct aca agc act gtg ctg ggt	1085		
Leu Val Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Ala Thr Ser Thr Val Leu Gly			
215	220	225	230



gtt ctg act gga ttg ctt agt gca tac atc ata aaa aag ctc tat ttt			1133
Val Leu Thr Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys Lys Leu Tyr Phe			
235	240	245	
gga agg cac tcc act gat cgc gag gtt gcc ata atg ata ctc atg gct			1181
Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile Met Ile Leu Met Ala			
250	255	260	
tat ctg tcg tat atg tta gct gaa tta ttc gat ttg agc ggt atc ctc			1229
Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Asp Leu Ser Gly Ile Leu			
265	270	275	
acc gtg ttc ttc tgt gga att gtg atg tcg cac tat aca tgg cac aat			1277
Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr Trp His Asn			
280	285	290	
gtc act gaa aac tca aga gtt acc acc aag cat aca ttt gcg aca ttg			1325
Val Thr Glu Asn Ser Arg Val Thr Thr Lys His Thr Phe Ala Thr Leu			
295	300	305	310
tca ttt gtt gct gaa ata ttt ata ttt ctg tat gtt ggc atg gat gct			1373
Ser Phe Val Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr Val Gly Met Asp Ala			
315	320	325	
tta gac att gag aaa tgg aga ttc gta agc ggc agc atg aca aca tct			1421
Leu Asp Ile Glu Lys Trp Arg Phe Val Ser Gly Ser Met Thr Thr Ser			
330	335	340	
gca gct gtc agt gca act ctg ctg gga ttg gtt ttg ctc tca aga gca			1469
Ala Ala Val Ser Ala Thr Leu Leu Gly Leu Val Leu Leu Ser Arg Ala			
345	350	355	
gcc ttt gta ttc cct tta tca ttt ctc tcc aat ctg gcc aaa aag tcc			1517
Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Ala Lys Lys Ser			
360	365	370	



cca ctc gaa aaa atc agt ctc agg cag caa att ata ata tgg tgg gct			1565
Pro Leu Glu Lys Ile Ser Leu Arg Gln Gln Ile Ile Ile Trp Trp Ala			
375	380	385	390
ggt ctt atg cgc gga gcc gtt tcc atg gct ctt gct tac aag cag ttt			1613
Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu Ala Tyr Lys Gln Phe			
395	400	405	
act aga gaa ggt ctc aca gtg gaa cgt gaa aat gcc ata ttc atc acc			1661
Thr Arg Glu Gly Leu Thr Val Glu Arg Glu Asn Ala Ile Phe Ile Thr			
410	415	420	
agt aca atc acc att gtg ctc ttc agc act gtg gtg ttt ggt ttg atg			1709
Ser Thr Ile Thr Ile Val Leu Phe Ser Thr Val Val Phe Gly Leu Met			
425	430	435	
acg aag ccc ctc atc aat tta ctg ata ccc tca cca aag ctt aac aga			1757
Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Ile Pro Ser Pro Lys Leu Asn Arg			
440	445	450	
tcg gtc tct tca gaa ccg ctg act cca aac tcc atc aca atc cca ctt			1805
Ser Val Ser Ser Glu Pro Leu Thr Pro Asn Ser Ile Thr Ile Pro Leu			
455	460	465	470
ctc ggg gaa agt cag gac tct gtg gcc gaa cta ttc agc atc aga ggt			1853
Leu Gly Glu Ser Gln Asp Ser Val Ala Glu Leu Phe Ser Ile Arg Gly			
475	480	485	
caa act tca caa ggt ggc gaa ccc gtt gct cga ccg agc agc cta cgc			1901
Gln Thr Ser Gln Gly Glu Pro Val Ala Arg Pro Ser Ser Leu Arg			
490	495	500	
atg tta ctc aca aag ccc act cat acg gtg cac tat tat tgg aga aaa			1949
Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys			
505	510	515	



ttc gac aat gct ttt atg cgt ccg gtc ttt ggt ggg cgt ggc ttt gta 1997

Phe Asp Asn Ala Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val

520 525 530

cca tat gtt ccc ggt tca ccg act gaa cga agc gtt cgc aac tgg gaa 2045

Pro Tyr Val Pro Gly Ser Pro Thr Glu Arg Ser Val Arg Asn Trp Glu

535 540 545 550

gaa gag acc aaa cag taaaaagatt ttcttgttg aatgatggtg aagagattag 2100

Glu Glu Thr Lys Gln

555

attctttgga tattcgaaa tcttatttct aatgtgtcac ctggaaagg ttgaatgaa 2160

attatattat cgactggaaa tcgactttgc gcttggaaa ggaatatttc ttctggattt 2220

tgcataaaa cctcaatgtat aggggggtgtg atatttttagt tagaaactga gtcgtttgat 2280

gtatattgtt ggtatgcag ctgggttttgg tttgtatgt atagtcataca agtgtgtatt 2340

tattcatatt gttatgcagt c 2361

< 2 1 0 > 19

< 2 1 1 > 555

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Torenia hybrida

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 19

Met Gly Phe Glu Ser Val Ile Lys Leu Ala Ala Ser Glu Thr Asn

5 10 15

Leu Trp Ser Ser Gly His Gly Ser Val Val Ala Ile Thr Leu Phe Val

20 25 30

Thr Leu Leu Cys Thr Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn

35 40 45



Arg Trp Met Asn Glu Ser Ile Ile Ala Leu Ile Ile Gly Leu Ala Thr

50 55 60

Gly Val Ile Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu

65 70 75 80

Val Phe Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Ala Leu Pro Pro Ile Ile

85 90 95

Phe Asn Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe

100 105 110

Ala Thr Ile Met Met Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile

115 120 125

Ile Ile Ser Leu Gly Thr Ile Ala Phe Phe Pro Lys Met Asn Met Arg

130 135 140

Leu Gly Val Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr

145 150 155 160

Asp Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu

165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser

180 185 190

Val Val Leu Phe Asn Ala Val Gln Asn Phe Asp Leu Pro His Met Ser

195 200 205

Thr Ala Lys Ala Phe Glu Leu Val Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Ala

210 215 220

Thr Ser Thr Val Leu Gly Val Leu Thr Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile

225 230 235 240

Ile Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala

245 250 255



Ile Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe

260 265 270

Asp Leu Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser

275 280 285

His Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Asn Ser Arg Val Thr Thr Lys

290 295 300

His Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu

305 310 315 320

Tyr Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Arg Phe Val Ser

325 330 335

Gly Ser Met Thr Thr Ser Ala Ala Val Ser Ala Thr Leu Leu Gly Leu

340 345 350

Val Leu Leu Ser Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser

355 360 365

Asn Leu Ala Lys Lys Ser Pro Leu Glu Lys Ile Ser Leu Arg Gln Gln

370 375 380

Ile Ile Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala

385 390 395 400

Leu Ala Tyr Lys Gln Phe Thr Arg Glu Gly Leu Thr Val Glu Arg Glu

405 410 415

Asn Ala Ile Phe Ile Thr Ser Thr Ile Thr Ile Val Leu Phe Ser Thr

420 425 430

Val Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Ile Pro

435 440 445

Ser Pro Lys Leu Asn Arg Ser Val Ser Ser Glu Pro Leu Thr Pro Asn

450 455 460



Ser Ile Thr Ile Pro Leu Leu Gly Glu Ser Gln Asp Ser Val Ala Glu  
 465                  470                  475                  480  
 Leu Phe Ser Ile Arg Gly Gln Thr Ser Gln Gly Gly Glu Pro Val Ala  
 485                  490                  495  
 Arg Pro Ser Ser Leu Arg Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His Thr Val  
 500                  505                  510  
 His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met Arg Pro Val Phe  
 515                  520                  525  
 Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Tyr Val Pro Gly Ser Pro Thr Glu Arg  
 530                  535                  540  
 Ser Val Arg Asn Trp Glu Glu Glu Thr Lys Gln  
 545                  550                  555  
 < 2 1 0 >    20  
 < 2 1 1 >    6298  
 < 2 1 2 >    DNA  
 < 2 1 3 >    Ipomea nil  
 < 2 2 3 >    Nucleotide sequence of promoter region of gene  
                   coding for protein having an activity to control  
                   pH in vacuoles  
 < 4 0 0 >    20  
 gatctcagtc tgtggatgtc ctagagacat tcataattga agttgagagt tagctaaata    60  
 gaaaggtaaa gacaattgga tcataataag gtgatgagta ttatggaaa ccatcaaaag    120  
 ttgggcaaat tcccgcccc ttaagaaaat tcctcgaatc taaaggcatt tgtgcataat    180  
 acacaatgtc aggcacaccca caacaaaatg gtgtggaaga aaggtgaaat cgtactctaa    240  
 gggaaatggt taggagttag gtaaataatt gtacattgct tgtttcattg tggatatatg    300  
 cattaaaaac aacagcatac ttactcaata gggttcctag taaggttgtt ttttaaaaca    360  
 ccttatgaac tgtggacaag aaggaaacct agtttgagac atcttcacat tcagggttgt    420



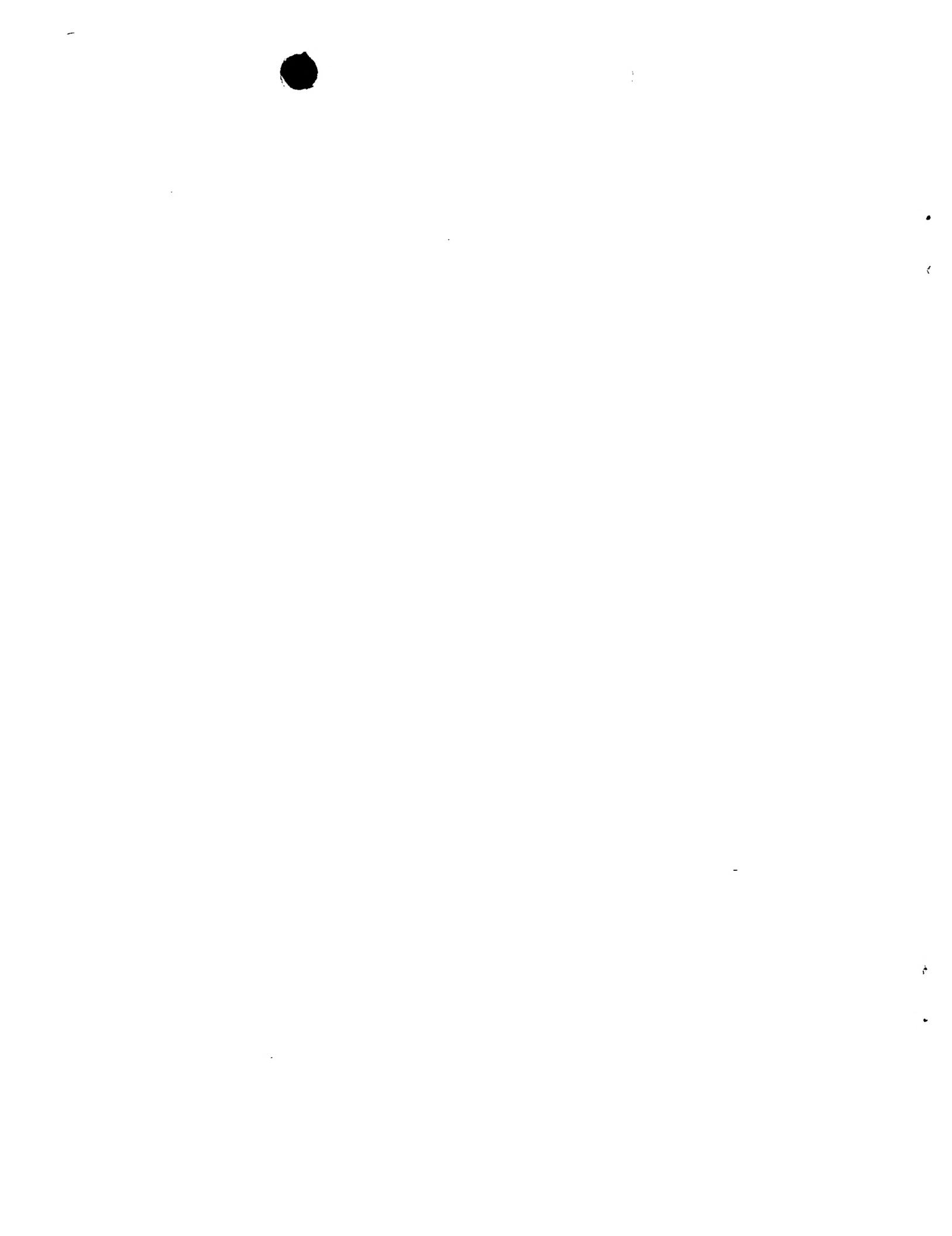
caagctggag tcatgtatata taatccacat gaaaataaat tatggatatc cagaaccatt	480
aatggttatt tcattggata tccagaaagg tctaaaggta catgtttatt gtcctaata	540
taagtacgag gattgttgag tctggtaatg ctgcgttcat ttaaaatggc gaagtcagtg	600
ggagtgtggg agctcgtaat gttaaaatta aggagtattt gatggttcta gattcatcaa	660
gtgatccccc ttccctgtt tgttccat tttgcagtg cagttagcc ttatggaaat	720
actttggAAC aacagcaact agatgctaa attccacatg aggaagctat tgtaatgaa	780
gatgaggttt aaactcaaga tcatgtatca gtaaaatctc agcaggaagt gacattaagg	840
aggctacta tagatagaaa agatcaacca ttcttgatga ctatattgtt tatacacttg	900
agcattgata attatccagt ctcatttaac caagccatac aggataataa ttcccttga	960
ggattatttt ggtttgggt gctcattctg ttcttgagct ccaccaaattt gttttaaaa	1020
ttacctttctt gaatggtaaa ttAAAAGAGG aagtatacat ggattagccg taaggcttca	1080
tggccacagg aaaggAAAT ctggtatgtt gattgaagat gtcgatctat ggattaaaac	1140
atgcttctag acaatggtac ttgagattgt cattttggttt tttttttttt actgttgatc	1200
ggtgtatcca cataaaggtt taatggaaagc aagtttgtaa tccttagtatt acatgttaac	1260
gacattcttc ttgctgctaa taataaaagg gatgttgcgt gatgttaagg aatagcttc	1320
taagaacttt gaaatggagg atatgggtga gacttcata gttttttttttaa taagaaatat	1380
tccgtatag atcacatggg attttaggtt catcctagaa gactcacatt aacaaagttt	1440
tagaaagata caaactggaa atctgcaaag agggtcctgt gatacttaca aggactaaag	1500
gaccacatgc tcacctataa aatgaacgaa taaccttagag gttataggtt attcggattc	1560
agactatgcc ggttttttttgg atacccgaaa atccacattc gaatatattt ttccacttgc	1620
tcgtggagca atatcttggta tgagtgttggaa ggagccgttc attgttactt ccactataag	1680
ggcagaattt gtagcatgtt ttgaggctgtt tagacactat aaaaattggc tgccttgc	1740
caacatcatt tgcattccatc tataagcatc tccatTTTGTGAA aacatcattc gatttttata	1800
gctggatgaa gatgattcac tgcactttgg ttgcatttttggaa aagctgcgt tgctatcgaa	1860
aacaaataac ctatctat aaaaacaaacg acttagattt aggaaataag aaggaagata	1920
cttttttaa aatccccaaa ttacctttta ggtttgaccc gcaaaataaca cttaagatc	1980
aaatcagata aaatgtcata atcaatgtatc aaattgtatc attttagtag tcgaggatca	2040



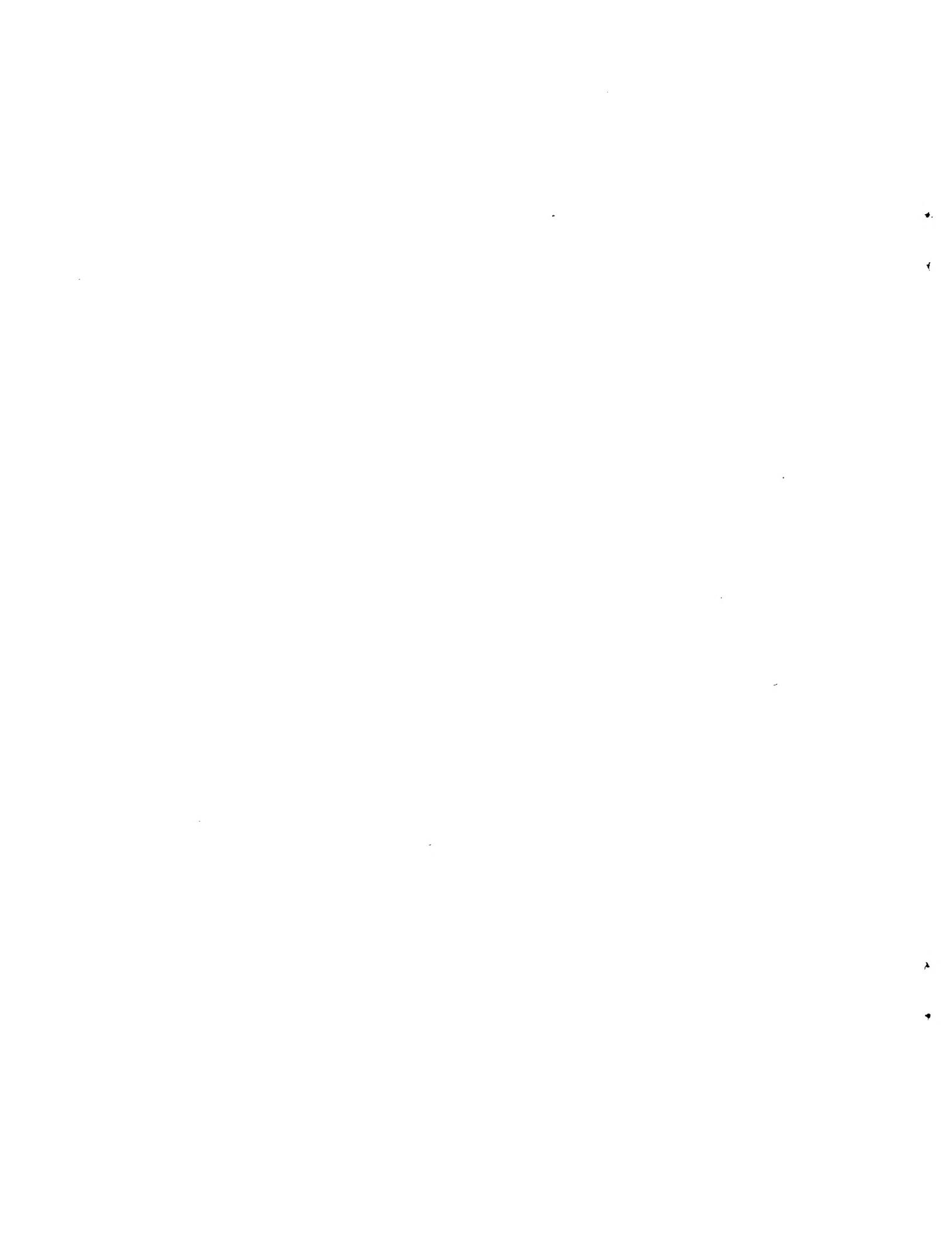
aattggtaaa atccccatag tcgagggact aaaccagtaa tttctcgcg tttgaacgtt	2100
tgtccgaaaa ttggcattag cgatagctt attgagttt tcaattctct aatttttaa	2160
attttgttc ttcataaaaat ctttcacttt ttcactttgc taatatttg ccgaatttat	2220
aatatttcca atttctaaag tagcagaacc ccagacgtt aactgccaat ttttttttt	2280
gtttttgtt ttttttttt tatttcctt tccctccacc tcatttgaa gttattttt	2340
attattaatt cattaatttt taaaatagag agactgcatt aacacaaaat tagccaatta	2400
ggtagcagaa ttaaatttaa acaaacaagt tggttaatg taattttgt caatttaatt	2460
tctctattt tggacaaaaa ttaggttagac ttattaaatt aaataaacat gtttggtaa	2520
ttttacttct tctacctaag tttgtgtcaa ttcatgtct ctattttata aattaatgaa	2580
tggtaaata taacttataa gtgcattgtg tccaaatgtat cacaagagtt aggccaactt	2640
ctttttcat ataggtgatt ctttttcga gtattacgtt cacttcagtc ttgtcaacta	2700
acacttagaa ttaggtgtc attttcgaac ataggtgtca actaagttt gtagccacta	2760
tatagcacat gtattccaag agatttaatc tcattcatca tgacaacttc tctaccaatt	2820
ctttgctcaa tcttttagtt agcgaattcg ctatattatc ctataacttt cagtagtc	2880
aacaaaaata aaatgtattt caagaaacta ttaatagtg tatgttatgt atatgtccta	2940
tatgtctaga cttaccgtta tacatattac taatttacta tatgtccttc caattgcga	3000
ttgactatcg taatgcatac atattggaga tatatatttt ttctagggtt aaatgcaggt	3060
tggatcgacc cattaggcct gccccaacgc aaacttttt tgtcggtt ttgcggaccg	3120
gcttgcgggt tagaaaatac acagcccaag cccgtccatg cgggctcgcg ggccttattt	3180
aaaaaaaaaaa aaaaatacta cgtattattt tattttta tattcaaata gtctaata	3240
aataaataaa aaaatcggt ttgaaaatta cttttttttt tatatatatt ttttaaaatt	3300
ttaatgttat atacgaagtg tgtgtatat atatatatat atatatatat atatatatat	3360
atatatatat atatatatat attattata ttatttatat ttatgtttat attaaatac	3420
gggcatggct cgtcggctgg tccgttaggt ccgtctttt gtaggccatt ttttgcgtg	3480
accctaaatc gtctcaccgc gggacaagta tagggcagct tgcggacttc ggtccattt	3540
gacatataata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata	3600
tatatatata taacattaaa attaaaaaaa tatagattt tttaaacat gaaaaaaatt	3660







tgtacaaaaa aaacttaacg aaaaaaacaa acataaataa ggggtataac tttcattcac 5340  
acttattatg ttttagatt agatttaacc atacatgcat taatttgtaa aatagcgaga 5400  
gtgaattaac acaaaattag gtagaagaag taaaattaaa caaacatgtt tatttaattt 5460  
aacaagtcca cctaattttt gtccaaaaat agagaaatta aattgacaaa aattacatta 5520  
aacaaacttg ttttttaaa ttgaattctt ctacctaatt ggctaattt gtgttaatgc 5580  
agtctctcta tttaaaaat taatgaatta ataataataa ttaacttcaa aatgagggtgg 5640  
agggataagg aaataaaaaaa acaaaaaaca aaaacaaaaa aaaaaaattt gcagttcaac 5700  
gtctggggtt ctgctacttt aaatactgat aggagagttg tcgttcattt tacaagtatt 5760  
aaggatgtac acgtatttagt aatgtaggct acagaaattt tcagacagat agatacataa 5820  
atccgtataa tagagacaga gaaacagaaa aagagagagt cacgttaatc ctgagatttt 5880  
cctccatttg tctgaagctc ttcatccttc aacactaccc ccacatctca ccttcagg 5940  
tccaatctt atcattcatc ttaatttcc agctctatct tgggatttgc atgtaaattt 6000  
tatttattt tcgggtttct gttccgatc ttatgcttt gttccaaagg gtatttgatt 6060  
tcatatatta tgagtttgc atgcatttc tctttgtaa aatgaaagaa aatttgagat 6120  
attggtggtt ttgatctgaa agtttggtttgc ttgcagtga ttgtatgtt ttcgggaggg 6180  
attggaatgg gcaacccgga tatgtgaaca gaaaccacga cattggaaa agatttattt 6240  
caaaaatgt ttgattgtt ttggattttg tgtagaaaaa agggaaagaa caaaaatg 6298



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05722

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/29, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00,  
C12P 21/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/29, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00,  
C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq, PIR/SwissProt

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.) 27.10月.1994 (27.10.94) & AU, 9465592, A & EP, 711347, A1 & US, 5534660, A & JP, 9-500006, A & AU, 686155, B & EP, 711347, A4 & US, 5910627, A	1, 7-14
A	Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger gene in Oryza sativa" Biochim. Biophys. Acta (1999, Jul.) 第1446巻 p. 149-155	1-14
A	Gaxiola, A. R. et al. "The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhX1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999, Feb.) 第96巻	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

引地 進

4 N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	p. 1480-1485  Lu, P. Y. et al. "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 第94巻 p. 8243-8248	1-14
A	Marrs, A. K. et al. "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995) 第375巻 第6530号 p. 397-400	1-14
T	Tanaka, S. et al. "Colour-enhancing protein in blue petals" Nature (2000, Oct.) 第407巻 p. 581	1-14

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ISHIDA, Takashi  
 A. Aoki, Ishida & Associates  
 Toranomon 37 Mori Building  
 5-1, Toranomon 3-chome  
 Minato-ku  
 Tokyo 105-8423  
 JAPON

15

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 01 March 2001 (01.03.01)			
<b>Applicant's or agent's file reference</b> H794-PCT		<b>IMPORTANT NOTICE</b>	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/05722	<b>International filing date (day/month/year)</b> 24 August 2000 (24.08.00)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 24 August 1999 (24.08.99)	
<b>Applicant</b> SUNTORY LIMITED et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,EP,JP,NZ

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 01 March 2001 (01.03.01) under No. WO 01/14560

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	<b>Authorized officer</b>  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

0	受理官庁記入欄 国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国 際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.07.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受 理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	H794-PCT
I	発明の名称	液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子
II	出願人 II-1 この欄に記載した者は II-2 右の指定国についての出願人で ある。 II-4ja 名称 II-4en Name II-5ja あて名:  II-5en Address:	出願人である (applicant only) 米国を除くすべての指定国 (all designated States except US) サントリー株式会社 SUNTORY LIMITED 530-8203 日本国 大阪府 大阪市北区 堂島浜2丁目1番40号 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他出願人又は発明者 III-1-1 この欄に記載した者は  III-1-2 右の指定国についての出願人で ある。 III-1-4ja 氏名(姓名) III-1-4en Name (LAST, First) III-1-5ja あて名:  III-1-5en Address:	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 飯田 滋 IIDA, Shigeru 444-0874 日本国 愛知県 岡崎市 竜美南2-4-1-3-21 2-4-1-3-21, Tatsumi-minami, Okazaki-shi, Aichi 444-0874 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP



特許協力条約に基づく国際出願願書  
原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	<b>出願人及び発明者である (applicant and inventor)</b> <b>米国のみ (US only)</b>
III-2-2	右の指定国についての出願人で ある。	田中 幸子 TANAKA, Sachiko 444-0802 日本国 愛知県岡崎市 美合町五本松61番地 61, Gohonmatsu, Miei-cho, Okazaki-shi, Aichi 444-0802
III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	Japan 日本国 JP
III-2-5en	Address:	
III-2-6 III-2-7	国籍(国名) 住所(国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	<b>出願人及び発明者である (applicant and inventor)</b> <b>米国のみ (US only)</b>
III-3-2 III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	右の指定国についての出願人で ある。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	稻垣 善茂 INAGAKI, Yoshishige 444-0851 日本国 愛知県岡崎市 久後崎町宮下2 城南ハイツ105 Jonanhaitsu 105, 2, Miyashita, Kugosaki-cho, Okazaki-shi, Aichi 444-0851 Japan 日本国 JP
III-3-5en	Address:	
III-3-6 III-3-7	国籍(国名) 住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通 知のあて名 下記の者は国際機関において右 記のごとく出願人のために行動 する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	<b>代理人 (agent)</b>
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja		石田 敬 ISHIDA, Takashi 105-8423 日本国 東京都 港区虎ノ門 三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 A. AOKI, ISHIDA & ASSOCIATES Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8423 Japan 03-5470-1900
IV-1-2en	Address:	
IV-1-3 IV-1-4	電話番号 ファクシミリ番号	03-5470-1911



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)	
IV-2-1ja IV-2-1en	氏名 Name(s)	鶴田 準一; 福本 積; 西山 雅也 TSURUTA, Junichi; FUKUMOTO, Tsumoru; NISHIYAMA, Masaya	
V V-1	国の指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国	
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AU CA JP NZ US	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-I VI-I-1 VI-I-1-1 VI-I-1-2 VI-I-1-3	先の国内出願に基づく優先権主張 先の出願日 先の出願番号 国名	1999年08月24日 (24.08.1999) 特願平11-236800号 日本国 JP	
VII-I	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII VIII-1 VIII-2 VIII-3 VIII-4 VIII-5 VIII-6 VIII-7	照合欄 願書 明細書（配列表を除く） 請求の範囲 要約 図面 明細書の配列表 合計	用紙の枚数 5 19 2 1 3 39 69	添付された電子データ styh794.txt



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるカレオカル及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	石田 敬	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	鶴田 準一	
IX-3	提出者の記名押印		
IX-3-1	氏名(姓名)	福本 積	
IX-4	提出者の記名押印		
IX-4-1	氏名(姓名)	西山 雅也	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面 :	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月24日 (24.08.2000) 木曜日 17時03分11秒

H794-PCT

## 国際事務局記入欄

II-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05722

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, PIR/Swissprot

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.), 27 October, 1994 (27.10.94) & AU, 9465592, A & EP, 711347, A1 & US, 5534660, A & JP, 9-500006, A & AU, 686155, B & EP, 711347, A4 & US, 5910627, A	1, 7-14
A	Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger gene in Oryza sativa" Biochim. Biophys. Acta (July, 1999), Vol. 1446, pp.149-155	1-14
A	Gaxiola, A.R. et al. "The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNh <sub>x</sub> 1 and Avp <sub>1</sub> , can function in cation detoxification in yeast", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (February, 1999), Vol. 96, pp.1480-1485	1-14
A	Lu, P. Y. et al., "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene," Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997), Vol. 94, pp.8243-8248	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	earlier document but published on or after the international filing date
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 27 November, 2000 (27.11.00)	Date of mailing of the international search report 05 December, 2000 (05.12.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP00/05722

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Marrs, A. K. et al., "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995), Vol. 375, No. 6530, pp. 397-400	1-14
T	Tanaka, S. et al., "Colour-enhancing protein in blue petals," Nature (October, 2000), Vol. 407, p. 581	1-14

E.P

U.S

PCT

## 特許協力条約

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 H 7 9 4 - P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05722	国際出願日 (日.月.年) 24.08.00	優先日 (日.月.年) 24.08.99
出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
  - この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、スクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
  - この国際出願に含まれる書面による配列表
  - この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  - 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
  - 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  - 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
  - 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
- 2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
- 3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
- 4. 発明の名称は  出願人が提出したものと承認する。  
 次に示すように国際調査機関が作成した。

---

- 5. 要約は  出願人が提出したものと承認する。  
 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
- 6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 \_\_\_\_\_ 図とする。  出願人が示したとおりである.  なし  
 出願人は図を示さなかった。  
 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00;  
C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C17 C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq, PIR/Swissprot

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.) 27.10月.1994 (2 7.10.94) & AU, 9465592, A & EP, 711347, A1 & US, 5534660, A & JP, 9-500006, A & AU, 686155, B & EP, 711347, A4 & US, 5910627, A	1, 7-14
A	Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the Na+/ H <sup>+</sup> exchanger gene in Oryza sativa" Biochim. Biophys. Acta (1999, Jul.) 第1446巻 p. 149-155	1-14
A	Gaxiola, A. R. et al. "The Arabidopsis thaliana proton transport ers, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999, Feb.) 第96巻	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日  
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論  
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 27.11.00	国際調査報告の発送日 05.12.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) : 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	p. 1480-1485  Lu, P. Y. et al. "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 第94巻 p. 8243-8248	1-14
A	Marrs, A. K. et al. "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995) 第375巻 第6530号 p. 397-400	1-14
T	Tanaka, S. et al. "Colour-enhancing protein in blue petals" Nature (2000, Oct.) 第407巻 p. 581	1-14

